

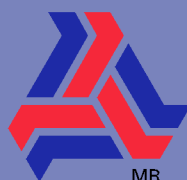
Revista del Centro de Investigación

UNIVERSIDAD LA SALLE



Temática Principal: Salud

- Ficobiliproteínas y Carcinoma Cervicouterino
- Daño A Los Hepatocitos Por Lectina Inhibible Por D-Galactosa/N-Acetil D-Galactosamina De Entamoeba Histolytica
- Validación de la medición retinol y tocoferol - sangre venenosa - sangre capilar
- Resistencia a los Antimicrobianos, *Staplylococcus aureus*
- Gnatostomiasis Humana
- Degradación del almidón
- Asbesto: y Salud
- Enseñanza situada: Vínculo entre la escuela y la vida



Rev. del Centro de Inv.(Mex) Vol. 7 Núm. 25 Ene. - Jun. 2006
(Publicación Electrónica)

*Revista
del Centro de
Investigación*

UNIVERSIDAD LA SALLE



*ISSN 1405-6690
(publicación electrónica)*

Nuestros autores

- **Ana Lidia Vargas-Rodríguez**

QFB (ULSA)

- **Ma. Luisa Vega-Barrita**

Departamento de Morfología.

- **Alfredo Cruz Orea**

Departamento de Física (CINVESTAV-IPN)

- **Roxana Olvera-Ramírez**

Departamento de Botánica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (IPN)

- **Eva Ramón Gallegos**

Departamento de Morfología (IPN)

- **Judith Pacheco-Yépez**

Doctorado en Ciencias (CINVESTAV-IPN)

Miembro del SNI .

- **Matilde Mineko Shibayama Salas**

Doctorado en Ciencias (CINVESTAV-IPN)

Miembro del SNI nivel I.

- **Víctor Tsutsumi**

Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (IPN)

Miembro del SNI nivel III.

- **Rafael Campos-Rodríguez**

Departamento de Bioquímica. (IPN)

- **Adrián Rondán-Zárate**

Médico Cirujano (UNAM)

- **Irene Montalvo Velarde**

Licenciada en Química (UNAM)

- **Mardya López Alarcón**

Doctora en Ciencias (Universidad de Cornell, USA)

- **René Casique Salvatierra**

Química en Alimentos (ULSA)

- **María Guadalupe Morales Meza**

Maestra en Ciencias. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (IPN)

- **Claudia Gabriela Ruiz de Chávez Ramos**

Licenciada en Química en Alimentos (ULSA)

- **Oscar Vázquez Tsuji**

Médico Cirujano (UNAM)

- **Teresita Campos Rivera**

Departamento de Parasitología y Micología. Instituto Nacional de Pediatría

- **Lilia Bernal**

Maestría en Ciencias Bioquímicas (UNAM)

- **Eleazar Martínez-Barajas**

Doctorado en Ciencias Químicas (UNAM)

- **Ma. Concepción Fortes Rivas**

Ing. Química (ULSA)

- **Brenda Elizabeth Garza Sandoval**

Lic. en Administración (ULSA)

- **Gerardo Hernández**

Mtro. en Psicología de la Educación (UNAM)

REVISTA DEL CENTRO DE
INVESTIGACIÓN
VOL. 7. NÚM. 25

Distribución y publicación: Dirección de Posgrado e Investigación de la Universidad La Salle

Dirección: Esther Vargas Medina

Responsable de la sección Temática: Dra. Judith Pacheco Yépez

Consejo Editorial: José Antonio Dacal, Mtra. Esther Vargas, Dr. Eduardo Gómez, Q. Irene Montalvo

Corrección de Estilo y Cuidado Editorial: Mario J. Salgado Ruelas

Diseño y Elaboración: Saracelly Gómez Ballesteros

Correspondencia:

Revista del Centro de Investigación.

Dirección de Posgrado e Investigación.

Benjamín Franklin # 47, Col. Hipódromo Condesa, México, D.F. C.P. 06140.

Tel. 5278 95 00 Ext. 2386, 2388

Fax. 5515 7631

E-Mail: revista@ci.ulsal.mx

<http://www.ci.ulsal.mx/revista>

Publicación Electrónica, impresión de 30 ejemplares para Resguardo Bibliográfico.

Reservado todos los derechos Posgrado e Investigación de la Universidad la Salle. Reserva para el uso exclusivo del título Núm. 04-2002-052810271000-102, ante la Dirección General de Derechos de Autor, certificado de solicitud de título Núm. 7960 y certificado de contenido Núm. 5638. ISSN 1405-6690. Los artículos firmados son responsabilidad exclusiva de los autores.

El logotipo y la denominación de la Universidad la Salle son marcas registradas.

Publicación indizada en:

CLASE (Citas Latinoamericanas en Ciencias Sociales y Humanidades), de la DGB-UNAM. Para consultas: <http://132.248.9.8:4500/ALEPH/spa/CLA/CLA/CLA/FIND-ACC/0102077>

IRESIE (Índice de revistas de Educación Superior e Investigación Educativa). Para consultas: <http://www.unam.mx/cesu/iresie1.htm>

LATINDEX (Directorio de Publicaciones Científicas seriadas de América Latina, el Caribe, España y Portugal). Para consultas: <http://www.latindex.unam.mx/directo.htm>

CAMEX (Catálogo comentado de Revistas Mexicanas sobre Educación Superior e Investigación Educativa) Prox. Edición en CD y vía internet. Para consultas: <http://www.latindex.unam.mx/directo.htm>

Red ALyC (Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal). Para consultas: <http://www.redalyc.com>



Dirección de Posgrado e Investigación

REVISTA DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN
UNIVERSIDAD LA SALLE
Vol. 7, Núm. 25. Enero-Junio de 2006

ÍNDICE DE CONTENIDO
SECCIÓN TEMÁTICA: SALUD

Artículos de Investigación

Efecto in vitro de las ficobiliproteínas en el tratamiento del carcinoma cervicouterino	5-12	Ana Lidia Vargas-Rodríguez Ma. Luisa Vega-Barrita Alfredo Cruz Orea Eva Ramón-Gallegos Roxana Olvera-Ramírez
Daño a los hepatocitos por lectina inhibible por D-Galactosa/N-Acetil D-Galactosamina de <i>Entamoeba Histolytica</i> .	13-32	Judith Pacheco-Yépez Víctor Tsutsumi Mineko Shibayama Adrián Rondán-Zárate Rafael Campos-Rodríguez
Validación de la medición de retinol y tocoferol por HPLC en muestras tomadas en gotas de sangre sobre papel filtro (GSS), y su comparación con sangre venosa y sangre capilar	33-43	Irene Montalvo Velarde Mardya López Alarcón René Casique Salvatierra
Diferencias en la resistencia a los antimicrobianos de cepas de <i>Staphylococcus Aureus</i> obtenidas de diversas fuentes de aislamiento.	45-64	María Guadalupe Morales Meza Claudia Gabriela Ruiz de Chávez Ramos
Gnatostomiasis Humana Abordaje, Diagnóstico y Tratamiento	65-76	Oscar Vázquez Tsuji Teresita Campos Rivera Adrián Rondán Zárate
Una nueva visión de la degradación del almidón	77-90	Lilia Bernal Eleazar Martínez-Barajas
Asbesto. Un peligro latente para la salud	91-108	Ma. Concepción Fortes Rivas Brenda Elizabeth Garza Sandoval

SECCIÓN NO TEMÁTICA
Reseña de Libros

Enseñanza situada: Vínculo entre la escuela y la vida. Frida Díaz-Barriga Arceo	109-114	Gerardo Hernández Rojas
Directorio	115	
Criterios para autores	117	

Investigación en Salud, una esperanza permanente

La ciencia, actividad permanente en el Hombre, se intensifica cuando se orienta a la comprensión de los grandes retos a los que nos expone la propia existencia.

El mantener la vida en condiciones de salud que nos permita desarrollarnos y colaborar con la construcción de un mundo mejor es un reto permanente.

En el mundo post-moderno, donde subsisten los contrastes evidentes de las condiciones de vida que el hombre no ha logrado solucionar, se observan esfuerzos en investigación que nos enfrentan a esas mismas diferencias; así observamos grandes avances en la Genética, en la atención al envejecimiento, en el avance de las técnicas de trasplantes, en el controvertido tema de la clonación, al mismo tiempo que importantes esfuerzos en temas relacionados con las enfermedades transmisibles, su tratamiento o los efectos que estos pueden causar cuando se asocian a una falta de cultura o a una necesidad extrema expresada en el caso de la automedicación. En el contexto nacional, la misma actividad científica en Salud toma sentido prioritario, al atender los problemas de salud que se generan y desarrollan asociados a la pobreza, y falta de conocimiento de los requisitos sanitarios en los que viven importantes núcleos de población. También se hacen evidentes condiciones adversas en el medio ambiente resultado muchas veces de un comportamiento irracional del propio ser humano en materia de recursos, a las que podemos asociar infecciones respiratorias agudas o en otros casos deficiencias y anemias nutricionales.

Pero presente está siempre la esperanza, el esfuerzo permanente se mantiene con los grupos de investigación que en diferentes regiones, con diferentes condiciones y ante planteamientos creativos que no abandonan el objetivo, se apoyan en el conocimiento, con una mente clara y rigor metodológico continúan con su quehacer diario.

El hombre voltea la vista y encuentra soluciones a veces prodigiosas, utiliza los medios de comunicación que han facilitado que grupos de investigación mantengan un contacto continuo sin importar la distancia, realicen proyectos interinstitucionales, donde reúnen fortalezas y aprovechan recursos para avanzar en este esfuerzo permanente. De la misma forma logran ser más eficaces al apoyarse en los desarrollos tecnológicos que permiten de forma casi inmediata obtener información que en otras épocas hubiera sido impensable.

Un mundo diferente, en continuo cambio nos ha tocado vivir, pero el trabajo de los investigadores en Salud, cuando se desarrolla en un marco ético y de responsabilidad social nos ayuda a mantener la confianza en el Hombre.

Efecto in vitro de las ficobiliproteínas en el tratamiento del Carcinoma Cervicouterino¹

Ana Lidia Vargas-Rodríguez
Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad La Salle
E-mail: aglae_ivanova@yahoo.es

Asesores:

Eva Ramón-Gallegos
Ma. Luisa Vega-Barrita
Departamento de Morfología
E-mail: evaramong@portugalmail.pt

Alfredo Cruz-Orea
Departamento de Física. CINVESTAV-IPN

Roxana Olvera-Ramírez
Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad La Salle

Recibido : Agosto de 2005. Aceptado: Octubre de 2005

RESUMEN

Las ficobiliproteínas (PBs) son los principales pigmentos accesorios de las algas rojas y de algunas cianobacterias. Tienen valor terapéutico como inmunomodulador, sin embargo en el tratamiento del cáncer su uso es escaso.

Las PBs son proteínas que tienen unidos a sus residuos de cisteína, grupos prostético tetrapirroles lineales. Estos grupos tienen dobles enlaces conjugados que permiten la transferencia de electrones, con lo cual podrían emplearse como fotosensibilizadores en la Terapia Fotodinámica (PDT).

Debido a que en México el cáncer cervicouterino es un problema serio de salud pública, es necesario encontrar opciones para abatir los costos y permitir la aplicación de diferentes terapias. Así, el objetivo de este trabajo fue comparar la respuesta de dos líneas celulares de cáncer cervicouterino (CaLo y HeLa) a las mismas concentraciones de PBs, manejando dos posibles tratamientos, en el primero únicamente exponiéndolas a las PBs y el otro con exposición simultánea a la irradiación con un láser de argón.

Se realizó una extracción de PBs a partir de un gramo de biomasa de *Pseudoanabaena*, en buffer de fosfatos. La caracterización se realizó mediante la lectura de la absorbancia de la muestra a 565, 620 y 650 nm para determinar las concentraciones de PBs. Para determinar la efectividad de las PBs en la PDT, se sembraron 5×10^4 células HeLa y CaLo por pozo en microplacas de 96 pozos. Las células se expusieron a las siguientes dosis de PE: 2.17×10^{-3} , 4.35×10^{-3} , 8.70×10^{-3} , 8.7×10^{-3} , 3.48×10^{-2} , 6.96×10^{-2} mg/ml. Después de 3h de exposición se irradiaron con un láser de argón a 127 J/cm^2 . Pasadas 24 h se determinó la viabilidad celular por el método del rojo neutro tanto en las células irradiadas como en las no irradiadas. Se

¹ Trabajo ganador de la Medalla "Hno. Salvador González 2005", Área Ciencias de la Salud, Nivel Licenciatura, Categoría Avanzada, XII Jornadas de Investigación, Universidad La Salle, Mayo 2005.

determinó que para HeLa las dos primeras dosis eran seguras, sin embargo cuando las células se irradiaron se determinó 46% de muerte celular en ambas dosis. En las dosis más altas la muerte celular fue del 48 al 57%. Sin embargo en CaLo no se observó diferencia significativa entre ambos tratamientos, mostrando una alta mortalidad indistintamente. Por lo que podemos concluir que el extracto presenta actividad citotóxica *per se*, mientras que por otro lado la PDT es efectiva para HeLa.

Palabras clave: ficobiliproteínas, carcinoma cervicouterino.

ABSTRACT

The phycobiliproteins are the main accessories pigments of red algae and of some cyanobacteria. They have a therapeutic value as immune-modulator, nevertheless there's only a scarce use of them in cancer treatment.

PBs are proteins having linked to their cysteine residues lineal tetrapyrrolic prosthetic groups. These groups have double conjugated links that allow electron transfer, thus they could be used as photo-sensibilizers in photo-dynamics therapy.

Due to the fact that cervical-uterus cancer is a serious problem of public health in Mexico, it is necessary to find less expensive options that allow the application of different therapies. Thus, the object of this work was to compare the answer of two cellular lines of cervical-uterus cancer (CaLo y HeLa) with the same PB concentrations, handling two possible treatments; in the first one, exposing them only to the PBs and, in the other one, with simultaneous exposition to irradiation with an argon laser.

A PBs extraction was made from a biomass gram of *Pseudoanabaena* in phosphate buffer. The characterization was made through the absorbing reading of the sample at 565, 620 and 650 nm to determine the PBs concentrations. To determine the effectiveness of PBs in PDT, 5X10⁴ HeLa y CaLo cells were planted by well in microplates of 96 wells. The cells were exposed to the following PE dosages: 2.17x10⁻³, 4.35x10⁻³, 8.70x10⁻³, 8.7x10⁻³, 3.48x10⁻², 6.96x10⁻² mg/ml. After 3 hr of exposure they were irradiated with an argon laser at 127 J/cm². After 24 hours cell viability was determined by the neutral red method both, in irradiated cells as well as in non irradiated ones. It was determined that for HeLa the two first dosages were safe, nevertheless when the cells were irradiated it was determined 46% of cellular death in both dosages. Within the highest dosages cellular death was from 48% to 57%. Nevertheless in CaLo no meaningful difference was observed between both treatments, showing a high mortality in both cases. We may conclude that the extract shows cytotoxic activity *per se*, while, in the other hand, PDT is effective for HeLa.

Key words: phycobiliproteins, cervical-uterus cancer

INTRODUCCIÓN

Del total de los cánceres, el 20% son hereditarios y el 80% son iniciados por agentes medioambientales (compuestos químicos, radiaciones, virus), los cuales provocan una mutación en algún gen que permite a la célula ciertas ventajas en su crecimiento. Un cáncer se origina cuando clones de células mutadas sobreviven y proliferan en forma inapropiada, rompiéndose el balance entre la proliferación celular y la apoptosis.

En algunas neoplasias intervienen oncogenes virales, como por ejemplo los oncogenes de los papilomavirus humanos (HPV) de alto riesgo en cáncer cervicouterino (CaCu). Estos virus favorecen la inestabilidad genómica de la célula infectada y la proliferación celular, al mismo tiempo que inhiben los procesos de apoptosis. El genoma de los HPV es de DNA de doble cadena, circular y formado por alrededor de 7,900 pares de bases. Los diferentes tipos de HPV tienen su genoma organizado de una forma similar, con genes de expresión temprana (E) y otros de expresión tardía (L) codificados

por la misma cadena de DNA (es decir, transcritos en un sólo sentido). La región temprana codifica para las proteínas oncogénicas E6 y E7, para proteínas que se necesitan en la replicación del genoma viral (E1, E2) y para una proteína (E2) que puede actuar como activador o represor de la transcripción de los oncogenes virales (E6, E7). Las oncoproteínas virales E6 y E7 inhiben la actividad de las proteínas antioncogénicas p53 y pRb, respectivamente (12,13).

Con base en la asociación con el cáncer genital, los HPV pueden clasificarse en grupos de bajo riesgo (tipo 6,11), riesgo intermedio (tipo 31, 33, 35) o alto riesgo (tipo 16,18)(7).

El cáncer cervicouterino es un problema de salud pública en mujeres que viven en países con deficiencias en los programas de prevención oportuna de cáncer. En el ámbito mundial, se estima que se presentan 231,000 muertes cada año, 80% de las cuales ocurren en países pobres.

Una estimación conservadora calcula que la prevalencia global de casos clínicamente reconocidos de cáncer cervicouterino es de 1.4 millones, y que entre 3 a 7 millones de mujeres en el mundo pueden estar sufriendo displasia de alto grado.(7)

Debido a que puede mantener un periodo de latencia prolongado y en sus inicios no causar molestias, este se identifica ya en sus fases avanzadas, en las que las acciones terapéuticas son muy agresivas y poco efectivas. En México y Centroamérica se reportan las más altas tasas de incidencia a nivel mundial, con 44.4 casos x 100,000 mujeres. A este respecto, las tasas de mortalidad por CaCu en México durante el año 2,000, son iguales a las que se presentaron al inicio de la década de 1980, por lo que ha habido un nulo impacto de los programas de detección oportuna del cáncer en nuestro país.⁷

Las ficobiliproteínas (PBs) son los principales pigmentos accesorios de las algas rojas y de algunas cianobacterias. Son ampliamente utilizadas como reactivos químicos fluorescentes, colorantes en alimentos y cosméticos.(1) Tienen un valor terapéutico como inmunomodulador y recientemente se ha incrementado el interés por su habilidad de revertir el fenotipo de multirresistencia a fármacos de varios tipos de células tumorales.(5) Las PBs son proteínas que tienen unidos a sus residuos de cisteína grupos prostéticos tetrapirroles lineales. Éstos absorben energía en la región visible del espectro (400-700nm)(3) y sus dobles enlaces conjugados les permiten la transferencia de electrones, por lo cual son aptos para su uso como fotosensibilizadores en la Terapia Fotodinámica (PDT). La PDT es una terapia contra el cáncer que aprovecha las ventajas que ofrece la interacción entre la luz, el oxígeno y un agente fotosensibilizador para inducir muerte en las células cancerosas por la formación localizada de especies reactivas de oxígeno (ROS).(10,11)

Debido a que en México el cáncer cervicouterino es un problema serio de salud pública, es necesario encontrar opciones que abatan los costos y permitan la aplicación de diferentes terapias. Así, el objetivo de este trabajo fue comparar la respuesta de dos líneas celulares de cáncer cervicouterino (CaLo y HeLa) a las mismas concentraciones de PBs, manejando dos posibles tratamientos; en el primero, únicamente exponiéndolas a las PBs y, en el otro, con exposición simultánea a las PBs y a la irradiación con un láser de argón.

METODOLOGÍA

Se realizó una extracción de ficobiliproteínas (PBs) a partir de un gramo de biomasa de *Pseudoanabaena*, en una solución amortiguadora de fosfatos.(2) La caracterización se realizó mediante la lectura de la absorbencia de la muestra a 565, 620 y 650 nm para determinar las concentraciones de ficocianinas (PC), ficoeritrinas (PE) y aloficocianinas

(AP).(14) Para determinar la efectividad de las PBs en la PDT fueron sembradas 5×10^4 células HeLa (línea celular derivada de un carcinoma cervicouterino) por pozo, en microplacas de 96 pozos. Las células se expusieron a las siguientes dosis de PE: 2.17×10^{-3} , 4.35×10^{-3} , 8.70×10^{-3} , 8.7×10^{-3} , 3.48×10^{-2} , 6.96×10^{-2} mg por mL de DMEM.

Después de 3h de exposición se irradiaron con un láser de argón a 127 J/cm^2 . Pasadas las 24 h se determinó la viabilidad celular por el método del rojo neutro en microplacas(8), tanto en las células irradiadas como en las no irradiadas. La línea celular CaLo se trabajó en las mismas condiciones.

Análisis estadístico: Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado. Para determinar la diferencia entre las células irradiadas y sin irradiar, se utilizó la prueba no paramétrica de t de Wilcoxon.

RESULTADOS

En el extracto crudo se concluyó que de las PBs, la más abundante fue la ficoeritrina, que ocupó el 47.98% (0.286 mg/ml); le siguieron las ficocianinas, que estuvieron presentes en un 31.32 % (0.187 mg/ml); y, las menos abundantes fueron las aloficocianinas, que se encontraron en un 20.64% (0.123 mg/ml), de tal manera que se decidió estudiar a la ficobiliproteína más abundante. Así, todas las concentraciones a probar se basaron en la ficoeritrina C.

Se determinó que para las células HeLa, las PBs sin irradiar en las dos primeras dosis (2.17×10^{-3} y 4.35×10^{-3} mg/ml) no provocaron muerte celular significativa, pero al ir aumentando las dosis se observó mayor muerte, encontrándose hasta un 44% en la dosis más alta (tabla 1); mientras que para las células Calo todas la dosis resultaron tóxicas (tabla 2) con un rango de mortalidad de 59.79% a 88.81%. Por lo que las PBs por sí solas son capaces de matar a las células cancerosas.

Posterior a la aplicación de la PDT en células HeLa se encontró que la muerte celular en las dosis seguras (2.17×10^{-3} y 4.35×10^{-3} mg/mL de PE), fue del 46% y 47% respectivamente (figura 1). En las dosis más altas la muerte celular fue del 48% al 57%. Al comparar el porcentaje de mortalidad entre las células irradiadas y las no irradiadas se determinó que la PDT, cuando utilizamos PBs e irradiamos con un láser de argón, mata significativamente ($p < 0.001$) más células que cuando éstas se exponen a las PBs solamente. Para las células CaLo (figura 2), sin embargo, se observó que ninguna de las dosis empleadas es segura. Por otro lado, no presentó diferencia significativa ($p > 0.200$) antes y después de la aplicación de la PDT.

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad de las células HeLa expuestas a diferentes dosis de PBs.

Ficobiliproteína [mg/mL]			% de mortalidad
Ficoeritina-C	Ficocianina-C	Aloficocianina-C	
2.17×10^{-3}	1.46×10^{-3}	9.61×10^{-3}	0
4.35×10^{-3}	2.92×10^{-3}	1.92×10^{-3}	4.3
8.70×10^{-3}	5.84×10^{-3}	3.84×10^{-3}	17.7
3.48×10^{-2}	2.34×10^{-2}	1.54×10^{-2}	21.8
6.96×10^{-2}	4.68×10^{-2}	3.08×10^{-2}	27.7
0.12	9.35×10^{-2}	6.15×10^{-2}	32.9
0.24	0.161	0.106	43.5

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad de las células CaLo expuestas a diferentes dosis de PBs.

Ficobiliproteína [mg/mL]			% de mortalidad
Ficoeritina-C	Ficocianina-C	Aloficocianina-C	
2.17×10^{-3}	1.46×10^{-3}	9.61×10^{-3}	59.79
4.35×10^{-3}	2.92×10^{-3}	1.92×10^{-3}	62.55
8.70×10^{-3}	5.84×10^{-3}	3.84×10^{-3}	84.94
3.48×10^{-2}	2.34×10^{-2}	1.54×10^{-2}	88.08
6.96×10^{-2}	4.68×10^{-2}	3.08×10^{-2}	85.31
0.12	9.35×10^{-2}	6.15×10^{-2}	82.46
0.24	0.161	0.106	88.81

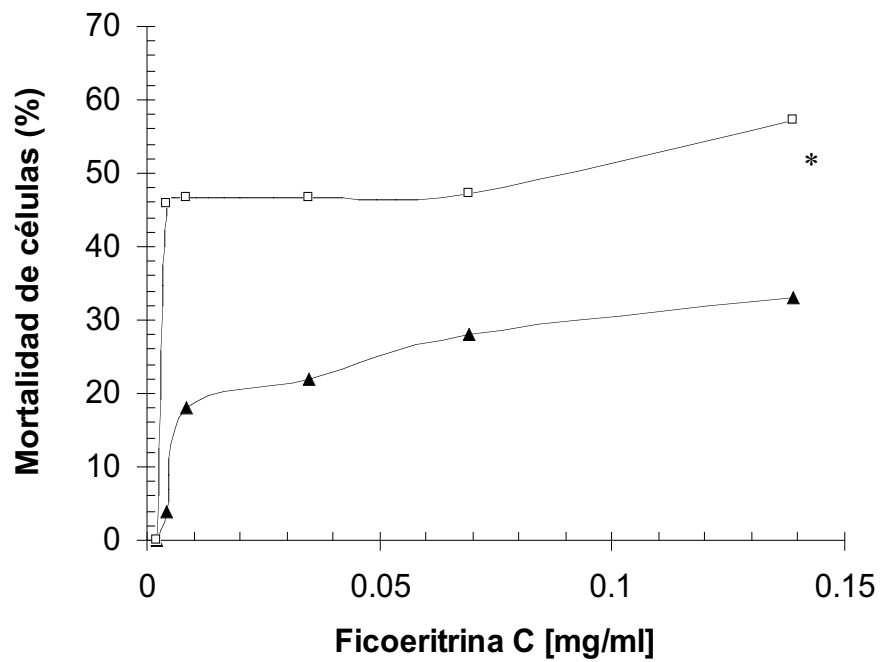


Figura 1. Mortalidad de las células HeLa expuestas a diferentes dosis de PBs, irradiadas (□) y sin irradiar (▲). *Diferencia significativa entre grupos.

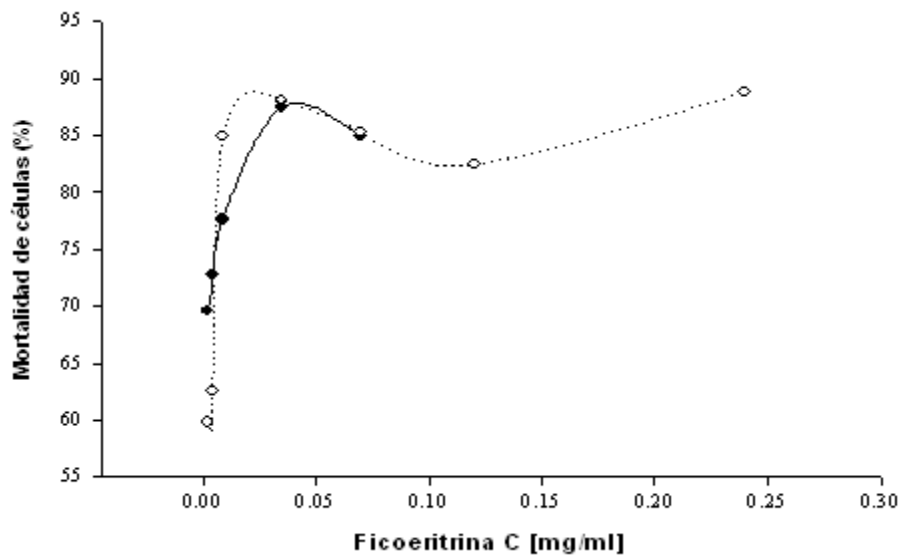


Figura 2. Mortalidad de las células CaLo expuestas a diferentes dosis de PBs, irradiadas (●) y sin irradiar (◊).

DISCUSIÓN

El efecto citotóxico del extracto crudo de ficobiliproteínas, cuando éstas son irradiadas, puede ser atribuido principalmente a la ficoeritrina, debido a que de las 3 ficobiliproteínas, es la única que absorbe a las longitudes de onda en la que emite el láser de argón utilizado. Éste tiene 3 líneas, emite a 488, 496 y 514 nm. Se ha reportado que las ficobiliproteínas tienen varios máximos de absorción, así encontraron que las PE absorben a 498, 545-546 y 565-568, las APC 598, 629 y 650 nm y las PC absorben a 615 y 617.(4,9) También se ha demostrado que al excitarse son capaces de transferir altas cantidades de energía, por lo que podemos sugerir que la citotoxicidad observada en los ensayos con células HeLa es debida al efecto fotodinámico que se lleva a cabo al excitar a la PE.

En estudios anteriores relacionados con productos de cianobacterias y el tratamiento del cáncer, se ha encontrado que la ficocianina-C es capaz de inducir apoptosis,(6) por lo que no se descarta la idea de que la presencia de esta molécula en el extracto crudo ensayado en este trabajo, esté provocando parte de la muerte celular, por lo menos en las dosis mayores a 5.84×10^{-3} mg/ml de ficocianina y 8.70×10^{-3} mg/mL de ficoeritrina, en las células HeLa, mientras que para CaLo esta puede ser la principal causa de muerte. Otro aspecto es que a las PBs se les ha atribuido la capacidad de revertir el fenómeno de multirresistencia a fármacos que presentan la mayoría de las células tumorales, así que la eficacia de la PDT puede también haber sido favorecido por esta propiedad del extracto probado.

Por otra parte se la reportado que CaLo es más susceptible que HeLa,(15) sin embargo, aun CaLo, sólo con la PBs a las mismas dosis utilizadas para HeLa, presentó mayor mortalidad, de tal manera que esto explica que después de la irradiación no aumentara la citotoxicidad debido a que la mayoría de las células ya habían muerto. Es importante señalar que la diferencia en el comportamiento de ambas líneas celulares, puede deberse a que CaLo posea un sistema antioxidante, por lo cual la irradiación no cause una diferencia significativa en cuanto a muerte celular.

CONCLUSIONES

En conclusión, al aplicar la PDT el efecto fotodinámico es debido únicamente a la ficoeritrina ya que es la única ficobiliproteína que absorbe a las longitudes de onda que emite el láser. Por otra parte el extracto crudo presenta una fuerte actividad citotóxica *per se*, como puede apreciarse para ambas líneas celulares y en especial en CaLo. Si bien se requieren más estudios al respecto, este trabajo abre una nueva rama de investigación citotóxica, con lo que se podrían desarrollar nuevos fármacos con alta efectividad sobre células tumorales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Biol. Celia Flores Granados del Departamento de Botánica por la identificación de la cepa de cianobacteria y a la QBP. Yavné Zamora Juárez por su ayuda en la realización de algunas de estas pruebas. Agradecen también al personal de la Central de Espectroscopia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, a la IBQ Esther Ayala Maycotte del Depto de Física del CINVESTAN-IPN, por las facilidades prestadas para la lectura de las muestras e irradiación de las células respectivamente.

Este trabajo fue financiado por el proyecto CONACYT No I39313-I y parcialmente financiado por el proyecto CGPI No: 20040129 ERG, ACO son becarios SNI. ROR es becario de COFAA.

REFERENCIAS

1. Bermejo R.R., Alvarez P.J.M., Ación F.F.G., Molina G.E. "Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*". *J. Biotechnology*, 93:73-85, 2000.
2. Boussiba S., Richmond A.E. "Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *spirulina platensis*". *Arch. Microbiol.*, 120:155-159. 1979.
3. Cañizares V. R.O., Rios L. E., Olvera R. R., Ponce N.T., Marque R.F.; "Fuentes Microbianas De Pigmentos". *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.*, 40: 87-107, 1998.
4. MacColl R., Guard-Friar D. (1987), *Phycobiliproteins*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
5. Moreliere *et al.* "Tolyphorhin: A Natural Product Cromo Cianobacteria With Potent Photosensitizing Activity Against Tumor Cells In Vitro An In Vivo", *Cancer Research*, 58: 3571-3578, 1998.
6. Pardhasaradhi B.V.V, Mubarak A.A., Leela A.K, Reddanna P., Khar A. "Phycocyanin-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves down-regulation of Bcl-2 and generation of ROS". *Oncol Res*, 6:211-218, 1994.
7. Perez Tamayo R.(2003), *El Cáncer en México*, Primera edición, El Colegio Nacional, México, pp. 129-234, 407-442.
8. Ramón G.E., Deleón R.I., Martínez G.L.A., Pérez Z.A.J, "In Vitro study of biosintesis of protoporphyrin IX induces by δ -aminolevulinic acid in normal and cancerous cells of the human". *Archives of Medical Research*, 30 (3):163-170, 1999.
9. Rowan SR (1989). *Photosynthesis Pigments of Algae*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
10. Sakharov Dv, Bunschoten A, Van Weeiden H, Wittz Kw, "Photodynamic Treatment And H₂O₂-Induced Oxidative Stress Result In Different Patterns Of Cellular Protein Oxidation", *Eur J Biochem.*, 720(24):4859-65, 2003.
11. Samia, Anna C. S.; Chen, X.; Burda, C.; "Semiconductor Quantum Dots For Photodynamic Therapy", *Journal Of The American Chemical Society*, 125(51): 15736-15737, 2003.
12. Salcedo M, *et al.* "Reduced retinoblastoma gene expression correlates with human papillomavirus- associated squamous uterine-cervix carcinomas." *Modern Pathology*, 17: 1031–1037, 2004.
13. Stöppler H, Stöppler MC y Schlegel R., "Transforming proteins of papillomaviruses". *Intervirolgy*, 37: 168-179, 1994.
14. Tandeau de Marsac N., Houmard J. "Complementary chromatic adaptation: physiology conditions and action spectra" *Methods in enzymology*, 167:318-328,1988.
15. Zamora-Juarez Y., Perez-Zapata A.J., Solano-Rodriguez L., Ramon-Gallegos E., Cruz-Orea A., "Photodynamic effect of modulated and continuos LASSER radiation on cancerous cells cultivated in vitro". *Physica Scripta*. Vol 71, 1-4, 2005.

Daño a los hepatocitos por lectina inhibible por D-Galactosa/N-Acetil D-Galactosamina de Entamoeba Histolytica.

Judith Pacheco-Yépez
Jefe del Área Ciencias de la Salud
Investigadora. Facultad de Medicina.
Universidad La Salle
E-mail: dopayj67@ulsa.edu.mx

Adrián Rondán-Zárate
Investigador. Facultad de Medicina.
Universidad La Salle

Mineko Shibayama
Víctor Tsutsumi
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Rafael Campos-Rodríguez
Departamento de Bioquímica. Escuela de Medicina. Instituto Politécnico Nacional.

Recibido : Agosto de 2005. Aceptado: Octubre de 2005

RESUMEN

La lectina de *Entamoeba Histolytica* se ha involucrado de manera importante en la patogenia de la amibiasis y se cree que participa en la adherencia de los trofozoítos a las células blanco. Además, se describe que la lectina puede dañar directamente a las células blanco. Por otro lado, el papel de los anticuerpos en la inmunidad protectora es controversial. En el presente estudio nosotros analizamos si la lectina se une a la superficie de los hepatocitos y los daña directamente; y, por otra parte, si los anticuerpos protegen del daño mediado por la lectina o bien, si pueden contribuir al daño de los hepatocitos.

Se analizaron las características de la interacción in vitro entre los trofozoítos y los hepatocitos de hámster, la especificidad de la unión mediante ensayos de competencia, incubando previamente con diferentes azúcares o bien con anticuerpos dirigidos contra la lectina. También se analizó el efecto de la lectina sobre la viabilidad y funcionalidad de los hepatocitos y el papel de los anticuerpos específicos hacia la lectina en fenómenos de protección.

Los resultados mostraron que cuando la lectina se unió a la superficie de los hepatocitos, algunos tenían signos de daño celular, principalmente presentándose cambios en la morfología celular y la presencia de núcleos picnóticos. Por otro lado, también se determinó que la lectina causaba citotoxicidad directa en los hepatocitos y, por último, se observó que los azúcares lactosa y NAcGal, así como los anticuerpos policlonales anti lectina Gal/GalNAc fueron capaces de inhibir la adhesión amibiana y en consecuencia reducir el daño en el cultivo primario de hepatocitos de hámster.

Palabras Clave: Entamoeba histolytica, lectina, cultivo primario de hepatocitos, anticuerpos, carbohidratos

ABSTRACT

The *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin is an important molecule involved in the pathogenesis of amoebiasis. It plays a role in the adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites to the target cells. Moreover, the lectin can damage directly the target cells. On the other hand, the role of the antibodies in the amoebiasis protection is controversial. Therefore, in the present work we analyzed the effect of the lectin in hepatocyte bindings. We studied also the role of antibodies in protection assays or if they contribute to hepatocytes damage.

We analyzed the characteristic of the in vitro interactions between *E. histolytica* trophozoites and hepatocytes using hepatocytes primary cultures, the specificity binding assayed studies we used different carbohydrates and anti-lectin antibodies. Finally, we studied the effect of lectin in hepatocytes viability and function, and the possible role of the anti-lectin antibodies in protection assays.

When lectin was bound to the hepatocytes surface, some of them showed signals of cellular damage, displaying morphological changes and an important number of hepatocytes showed picnotic nucleus. On the other hand, when lactose, N-acetyl Galactose and polyclonal anti Gal/GalNAc lectin antibodies were used before the interaction of amoebas with the hepatocytes monolayer, they were able to inhibit the adhesion to the target cells, therefore, we conclude that these molecules reduced significantly the damage of the primary hamster culture.

Key words: Entamoeba histolytica, lectin, hepatocytes primary cultivation, antibodies, carbohydrates.

INTRODUCCIÓN

La adherencia es un requisito para que las amibas puedan destruir a las células blanco (1,2). Las moléculas que participan en el proceso de adhesión son las lectinas (3,4,5,6,7,8,9,10). La interacción se lleva a cabo por el reconocimiento de residuos de carbohidratos en la membrana de las células blanco. Los principales azúcares involucrados son la N-acetil-D-galactosamina (GalNAc), la galactosa terminal (Gal), y las unidades de lactosamina (Gal-1,4-GINAc) (11,5,6,12,13). Sin embargo, no parece existir reconocimiento de los residuos de N-acetil-D-glucosamina terminal (GlcNAc). Todo lo anterior sugiere que una interacción importante entre la amiba y sus células blanco se lleva a cabo por medio de lectinas o adhesinas específicas para Gal y GalNAc.

Por otro lado, *E. histolytica* activa el sistema de complemento pero es resistente al complejo de ataque a la membrana (C5b-9). Se ha visto que cuando se utilizan anticuerpos contra la lectina con especificidad para Gal se provoca un incremento en la lisis de los trofozoitos por C5b-9, sugiriendo que el sitio activo de la lectina que une carbohidratos puede contribuir a la habilidad de la lectina de bloquear el ensamble del complejo de ataque a la membrana. La participación de la lectina Gal/GalNAc en la adherencia, citólisis y resistencia al complemento sugieren que podría ser un buen candidato para vacunas; así, una vacuna anti-amibiana impediría la adherencia a la mucosa colónica y podría prevenir la colonización y el daño (14).

Existen resultados controversiales en cuanto a la protección de los anticuerpos contra la amibiasis. Por un lado, se ha sugerido que la lectina Gal/GalNac es capaz de inducir una respuesta inmuno protectora ya que los anticuerpos específicos pueden inhibir la adherencia de *E. histolytica* y la citólisis subsecuente de las células blanco. Un

gran número de proteínas amibianas son inmunogénicas, de manera que sujetos con absceso hepático amibiano tienen anticuerpos circulantes contra ellas, incluyendo anticuerpos contra las lectinas y adhesinas (15,16,17,18,19). Sin embargo, los anticuerpos séricos no curan la infección y tampoco evitan las reinfecciones, sobre todo del intestino (20). Adicionalmente, los anticuerpos pueden, al menos teóricamente, favorecer el daño hepático. En el absceso hepático amibiano experimental desarrollado en el hámster hay correlación entre el título de anticuerpos y la magnitud del daño (21). En jerbos inmunizados con la lectina de 170 kDa y posteriormente retados intrahepáticamente con trofozoítos virulentos de *E. histolytica*, la frecuencia de abscesos es mucho menor en comparación con los controles, sin embargo, los abscesos que se forman en los animales inmunizados son significativamente más grandes con relación a los que se forman en los testigos (22). También se ha reportado que los anticuerpos dirigidos contra un epítipo en la cadena pesada de la lectina de la amiba que es específica para D-galactosa y N-acetil D-galactosamina, incrementa el tamaño de los abscesos hepáticos en jerbos (epítipo no protector); por otro lado, los anticuerpos dirigidos contra un epítipo diferente confieren protección; es decir, el tamaño de los abscesos es menor (epítipo protector) (23).

Con los antecedentes mencionados anteriormente, en este trabajo se analizó si la lectina Gal/GalNac de *E. histolytica*, es capaz unirse a la superficie de los hepatocitos e iniciar alteraciones morfofuncionales o daño y, por otro lado, si los anticuerpos específicos para esta lectina pueden evitar o contribuir a la destrucción de los hepatocitos, dependiendo del epítipo reconocido y del tiempo de aparición de los anticuerpos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Purificación de la lectina Gal/GalNac.

La lectina con especificidad para Galactosa y N-acetil-D-galactosamina se purificó por cromatografía de afinidad siguiendo el protocolo previamente reportado (6).

Cultivo primario de hepatocitos de hámster.

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico. La cavidad abdominal se abrió y expuso la vena porta. El hígado se perfundió a través de la vena porta con una solución que contenía EGTA y colagenasa siguiendo la técnica reportada (24). Los hepatocitos se incubaron a 36.8 °C, en una atmósfera de 9 % de CO₂, las células no adheridas se eliminaron.

Interacción de trofozoítos de *E. histolytica* con hepatocitos de hámster.

La interacción se realizó con hepatocitos sembrados sobre cubreobjetos cubiertos con colágena tipo I, la relación de interacción utilizada fue de 8 hepatocitos por 1 amiba. Los tiempos de interacción empleados fueron 5, 15, 30 y 60 min. La viabilidad de las amibas se revisó mediante exclusión con azul tripano. Las muestras fueron fijadas con paraformaldehído. Estas muestras fueron procesadas para la detección de lectina mediante inmunocitoquímica.

Interacción de la lectina Gal/GalNac con hepatocitos de hámster.

Se interaccionaron hepatocitos de 24 h de cultivo con 4 µg de la lectina purificada, los tiempos de interacción fueron de 5, 15, 30 y 60 min. Las muestras se fijaron con paraformaldehído al 1.5% para posteriormente realizar una inmunocitoquímica utilizando anticuerpos anti lectina.

Inmunocitoquímica.

La peroxidasa endógena se bloqueó con metanol-H₂O₂, los sitios no específicos se bloquearon con suero fetal bovino al 10%. La inmunodetección se llevó a cabo con un anticuerpo monoclonal anti lectina diluidos 1:50 en PBS-Tween-suero fetal bovino, las

muestras se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente se agregó el conjugado de peroxidasa chivo anti IgG de ratón, diluido 1:500, después de una hora se reveló con DAB. Las inmunotinciones se examinaron por microscopía de luz.

Efecto citotóxico de trofozoítos de *E. histolytica* sobre hepatocitos de hámster.

La interacción entre los trofozoítos de *E. histolytica* y los hepatocitos de hámster se realizó a una relación de 1:8 empleando placas de 24 pozos. Los tiempos de interacción trabajados fueron de 15, 30, 40 y 60 minutos. Transcurrido el tiempo de interacción se adicionó MTT (3-(4,5-Dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromuro) 5mg/ml. Se incubó 30 minutos a 36.8°C y CO₂ al 8%. Se adicionaron 100µl de DMSO por pozo, se agitó un minuto y se leyó en un espectrofotómetro a 540nm.

Efecto citotóxico de la lectina de *E. histolytica* sobre los hepatocitos de criceto.

Se interaccionaron hepatocitos con la lectina Gal/GalNac de *E. histolytica*. Los tiempos de interacción fueron de 5, 15, 30 y 60 min. El control utilizado fue otra lectina no relacionada (concanavalina A) a la misma concentración que la lectina amibiana. Posterior a la interacción se adicionó el MTT y se midió la liberación de colorante en un espectrofotómetro a 540nm.

Bloqueo del daño de los hepatocitos por anticuerpos policlonales (IgG) anti lectina

Los trofozoítos se preincubaron con la IgG anti lectina 25-50µg durante 5 minutos, y enseguida se añadieron a la monocapa de hepatocitos. Después de incubar durante 30 y 60 minutos, se adicionó el MTT e incubó durante 30 minutos. Finalmente se adicionó el DMSO, las muestras se leyeron a 540 nm. Los controles fueron amibas que fueron preincubadas con suero normal de chivo.

Daño provocado a los hepatocitos mediado por anticuerpos policlonales (IgG) anti lectina y complemento

Los hepatocitos y las amibas se hicieron interaccionar durante 15 minutos a una relación de 8:1, transcurrido este tiempo se adicionó simultáneamente la IgG anti lectina a concentraciones de 25-50µg y complemento a concentraciones de 5 y 50µg. En otros experimentos, la lectina (10 µg) se hizo interaccionar con los hepatocitos durante 15 minutos a 37°C, después se adicionaron los anticuerpos anti lectina (50 µg) y complemento. Después de incubar a 36°C y 8% de CO₂ durante 15 y 30 minutos, se adicionó el MTT durante 30 minutos, y las muestras se leyeron a 540 nm. Los grupos testigos carecían de anticuerpos específicos y complemento.

Ensayos de bloqueo de la adhesión entre las amibas y el cultivo primario de hepatocitos mediante el uso de azúcares.

Las amibas fueron preincubadas durante 30 minutos con diferentes carbohidratos: Galactosa, Manosa, Lactosa, N-acetil Galactosamina (NacGal), N-acetil Glucosamina (NacGlu) y Melobiosa a concentraciones de 50, 100 y 200mM. Posteriormente las amibas se agregaron a la monocapa de hepatocitos y después de incubar por 30 min, se adicionó a la placa MTT disuelto en medio DMEM y se incubó a 36.8°C durante 30 min. Se adicionó DMSO a cada pozo para liberar los cristales de formazan. Después de 5 min se leyeron las muestras espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm.

RESULTADOS

Purificación de la lectina Gal/GalNac

La lectina Gal/GalNac se purificó mediante cromatografía de afinidad empleando anticuerpos monoclonales específicos para la subunidad pesada (170 kDa) de la lectina. La caracterización bioquímica se realizó por medio de SDS-PAGE (Figura 1); la tinción del gel reveló la presencia de las dos principales subunidades de la lectina, las cuales presentaron las masas moleculares estimadas, 170 y 35 kDa.

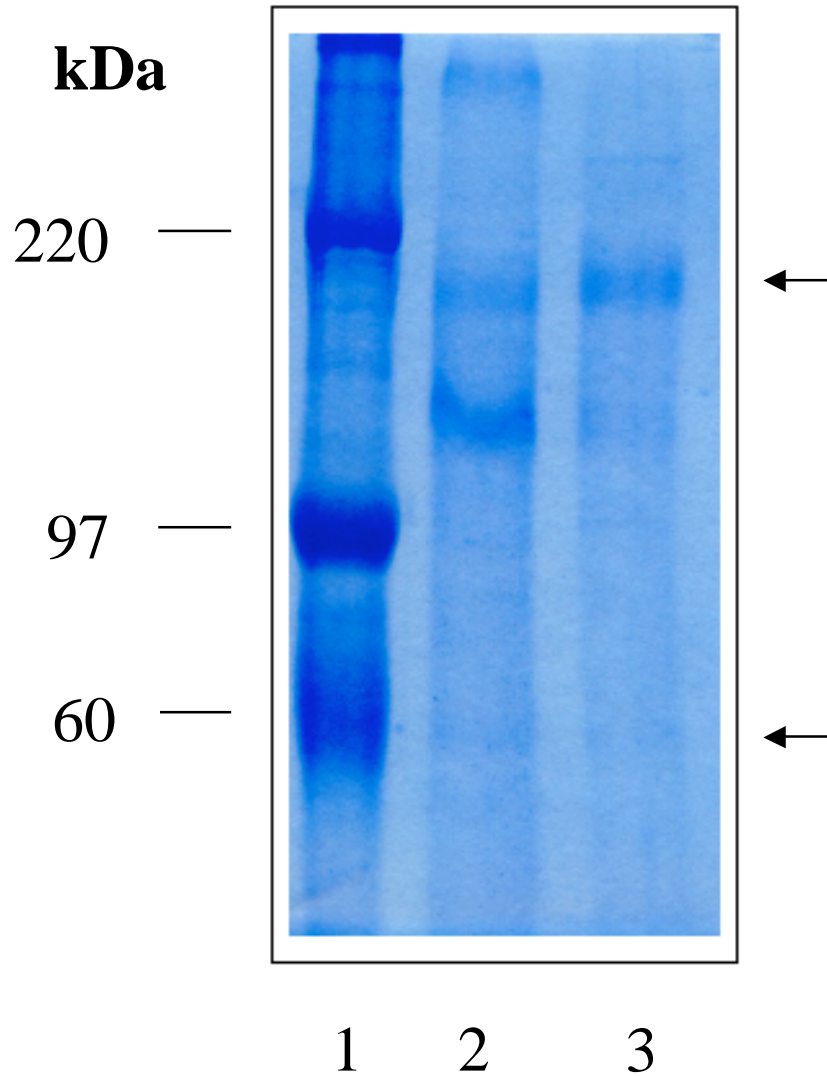


Figura. 1. SDS-PAGE de la lectina Gal/GalNAc purificada mediante cromatografía de afinidad.

Las proteínas eluidas de la columna de afinidad se separaron mediante SDS-PAGE al 10 %, bajo condiciones reductoras con β -mercaptoetanol. Carril 1 marcadores de peso molecular. Carril 2 y 3 muestran las migraciones de la subunidad pesada de 170 kDa y de la subunidad ligera de 35 kDa.

Interacción de trofozoítos de *E. histolytica* y hepatocitos de hámster

El progreso en la destrucción de los hepatocitos por acción de las amibas se siguió mediante un ensayo de citotoxicidad que se basa en la reducción del MTT. Los resultados muestran (Figura 2) que desde los primeros minutos de interacción entre las amibas y los hepatocitos se observa una drástica disminución en la viabilidad de los hepatocitos. A los quince minutos de interacción hubo disminución en un 60% de la

reducción del colorante lo cual indica que un gran porcentaje de hepatocitos fueron destruidos por las amibas. Este porcentaje no aumento significativamente a los 30, 40 y 60 minutos de interacción.

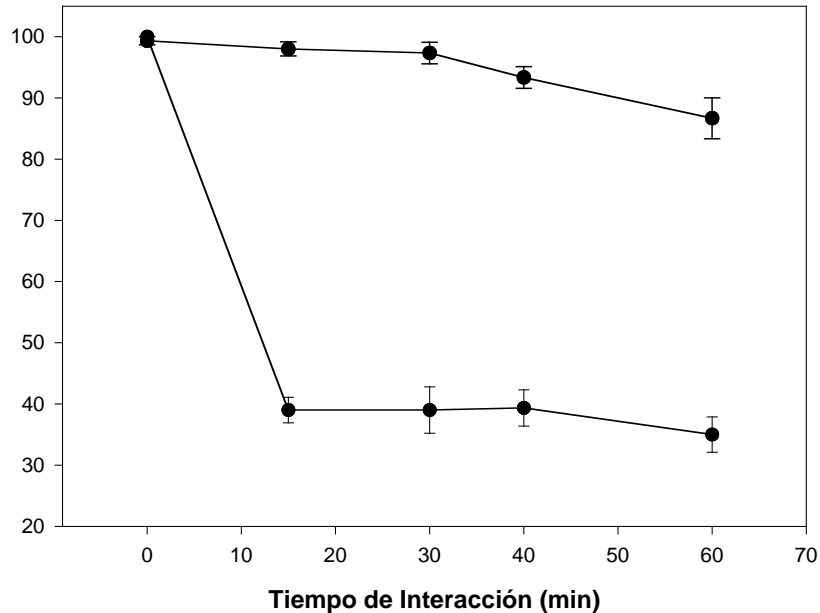
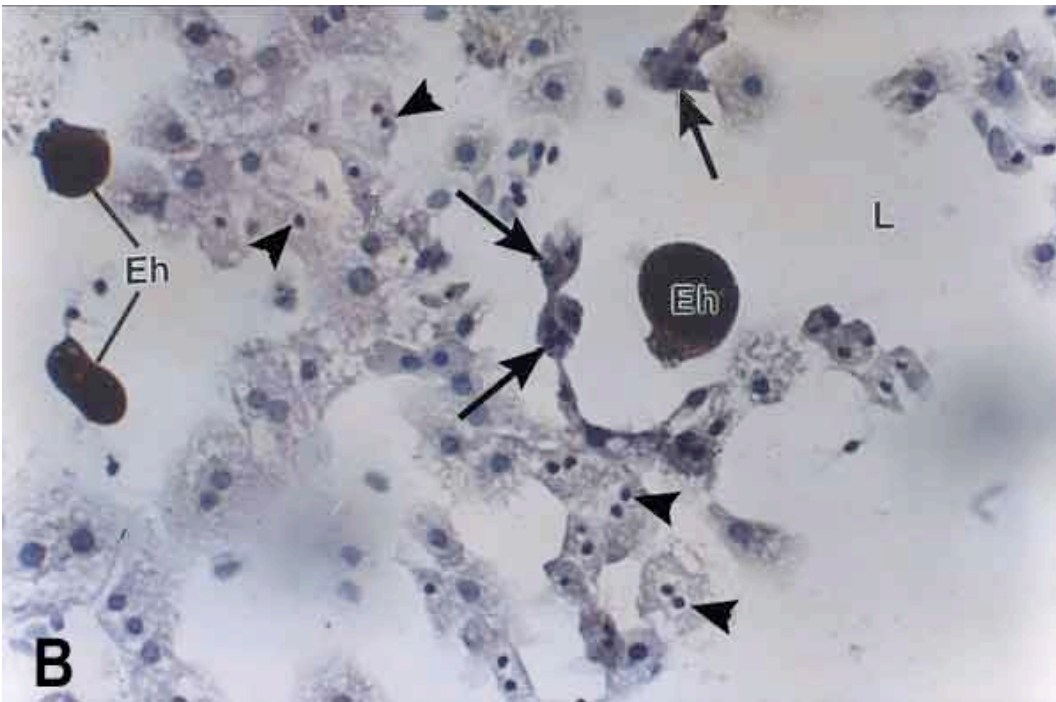
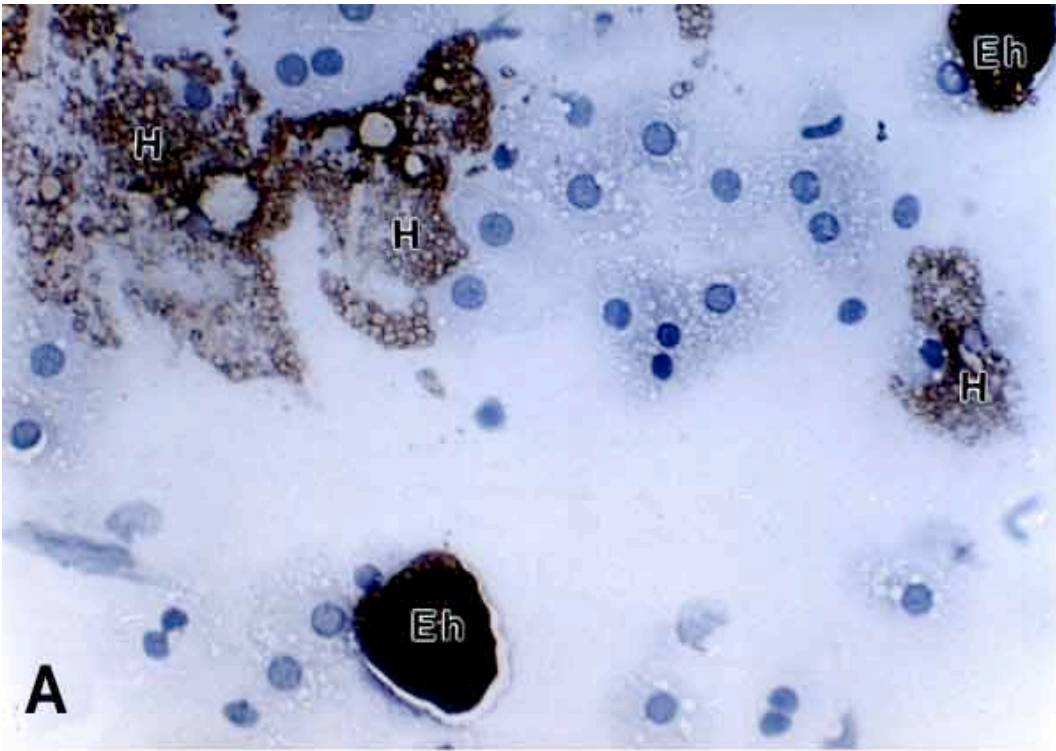


Figura 2.- Interacción de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y hepatocitos de hámster.

Los hepatocitos de hámster se cultivaron durante 24 horas. Trofozoítos de *E. histolytica* recientemente obtenidos se colocaron sobre la monocapa a relación de 1:8 trofozoítos/hepatocitos. Los tiempos de interacción fueron de 15, 30, 40 y 60 minutos. Al final del periodo se determino la reducción del MTT para cuantificar la viabilidad residual.

Análisis microscópico de la interacción *in vitro* de hepatocitos y trofozoítos vivos de *Entamoeba histolytica*

Desde los primeros minutos de interacción entre el cultivo primario de hepatocitos de hámster y los trofozoítos de *E. histolytica* se observó un cambio morfológico importante en el cultivo. A los 5 minutos los hepatocitos que habían sido contactados por las amibas empezaban a manifestar signos de daño, se redondeaban y presentaban algunas vesículas en su membrana. A los 15 minutos de interacción el daño al cultivo de hepatocitos era mucho más evidente, los hepatocitos en contacto con las amibas presentaban múltiples vesículas en su membrana, además mostraban pérdida de su arquitectura poliédrica característica, y se observó la presencia en el cultivo de restos celulares. En hepatocitos que no estaban en estrecho contacto con las amibas también manifestaban signos de daño; se redondeaban, perdían su forma característica y algunos mostraban sus núcleos desplazados a la periferia. A los 30 minutos el daño progresaba y se observó un número importante de hepatocitos desprendidos, mayor cantidad de detritus celulares, los hepatocitos dañados presentaban núcleos con apariencia picnótica y se perdían las uniones entre los mismos. A los 60 minutos el daño fue mucho mayor, una gran cantidad de hepatocitos adquirirían formas elongadas y presentaban núcleos picnóticos, la mayoría de los hepatocitos se habían desprendido y las áreas líticas en el cultivo eran más extensas. El daño ocasionado por las amibas al cultivo de hepatocitos se incrementaba con el transcurso del tiempo (Figura 3).



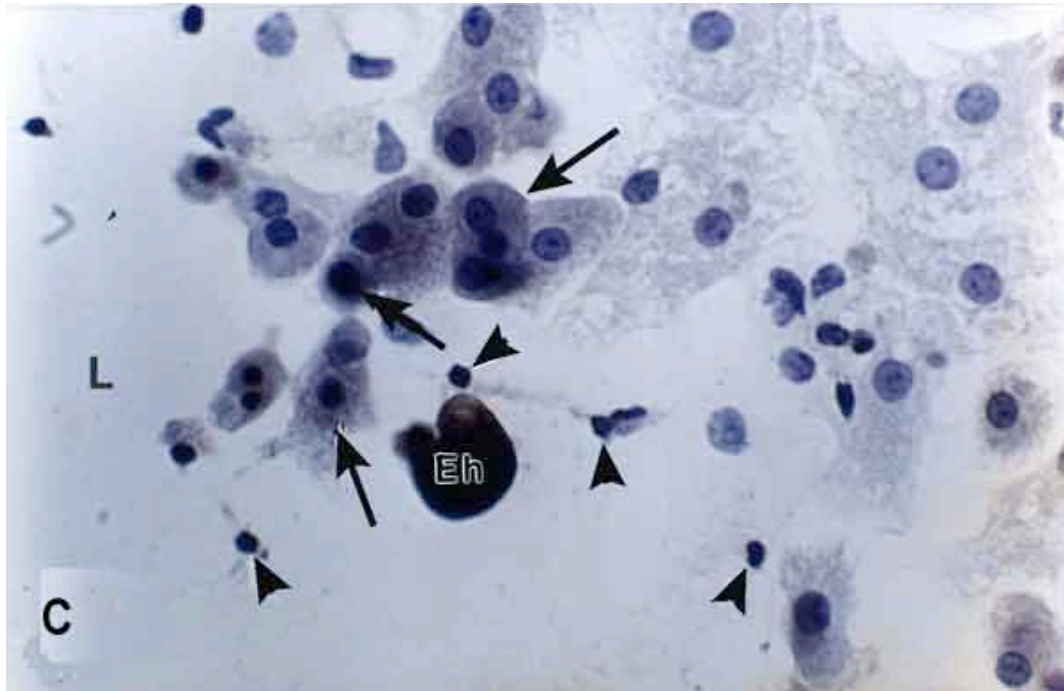


Figura 3.- Inmunocitoquímica de interacciones de amibas con hepatocitos de hámster.

(A) Quince minutos de interacción. Trofozoítos de *E. histolytica* (Eh) y algunos hepatocitos que muestran signos de daño (H) se marcan fuertemente a la lectina. El anticuerpo monoclonal anti lectina Gal/GalNAc marca hepatocitos distantes a las amibas (H). Otros hepatocitos con signos de daño y en contacto con las amibas no se marcan. (B) Treinta minutos de interacción. Amibas (Eh) y hepatocitos marcados a la lectina se observan elongados (flechas) y con núcleos picnóticos (cabezas de flecha). Se presentan zonas líticas (L). (C) Una hora de interacción. Grandes extensiones de zonas líticas (L) en la monocapa. Trofozoíto intensamente marcado (Eh) y hepatocitos marcados con la lectina (flechas). Se observan núcleos sueltos en las áreas líticas (cabezas de flecha).

Interacción de la lectina Gal/GalNAc con el cultivo primario de hepatocitos de hámster

Al analizar las interacciones de la lectina purificada con el cultivo primario de hepatocitos observamos un daño menor al presentado por las células del parénquima hepático cuando se interaccionaron con amibas íntegras. A los 5 min de interacción los hepatocitos presentaban cambios morfológicos que fueron indicativos de daño (Figura 4); a los 15 min algunos de los hepatocitos presentaban pequeñas vesículas en su membrana, aunque continuaba siendo menos evidente que cuando se les adicionaron trofozoítos de *E. histolytica*, a los 30 minutos el número de hepatocitos con signos de daño incremento, los hepatocitos perdían su arquitectura característica y adquirían formas redondeadas, algunos de ellos presentaban desplazamiento de los núcleos, además se observó un número creciente de hepatocitos que perdían su adhesividad y se desprendían de la superficie de la caja, a los 60 min el daño observado no fue mucho mayor al que presentaban los hepatocitos a los 30 min de interacción. Los hepatocitos testigo que fueron interaccionados con el amortiguador en el cual se encontraba diluida la lectina no presentaron daño alguno, mantuvieron su morfología característica y no perdieron adhesividad. Los resultados observados a microscopía óptica muestran cierto daño morfológico inducido por la lectina purificada al cultivo primario de hepatocitos de

hámster; no obstante, el daño fue mucho menor que cuando se interaccionó con la amiba completa.

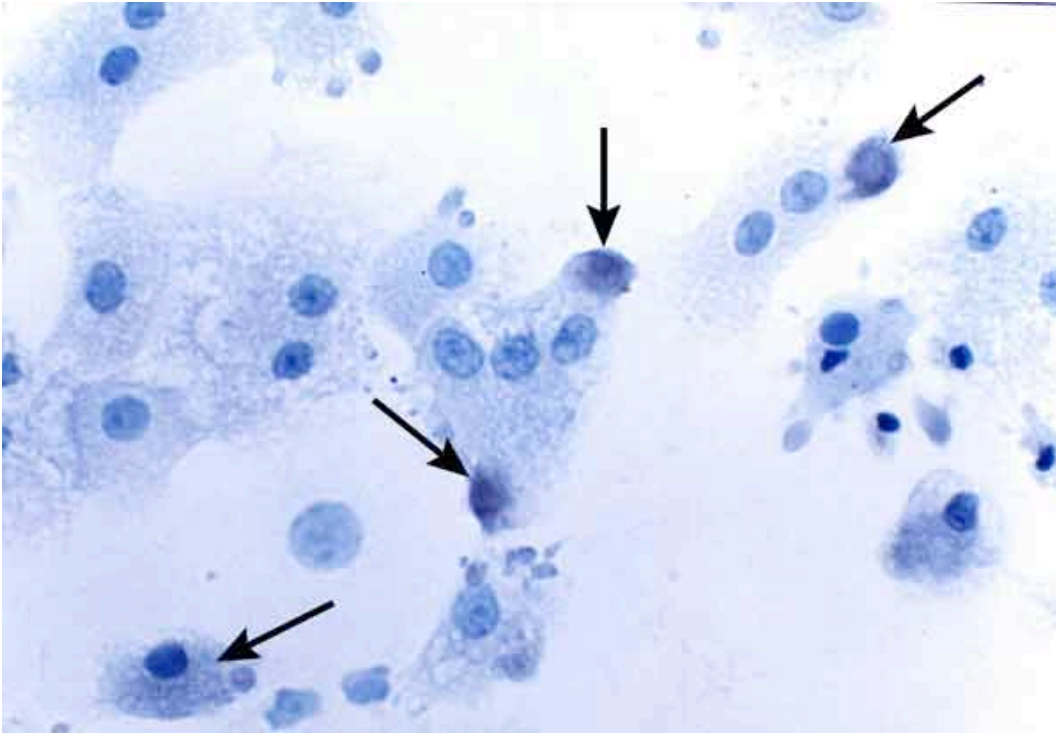


Figura 4.- Inmunocitoquímica de interacción de la lectina purificada con el cultivo primario de hámster.

Cinco minutos de interacción. La marca se encuentra presente en algunas áreas de la superficie hepática (flechas), otros hepatocitos no se marcan a la lectina. Algunos hepatocitos presentan signos de daño pierden su arquitectura característica y presentan núcleos picnóticos.

Efecto citotóxico directo de la lectina sobre los hepatocitos de hámster

Para analizar el posible efecto citotóxico directo de la lectina se hicieron ensayos de citotoxicidad *in vitro*. A la monocapa de hepatocitos se les añadió la lectina y después de incubar desde 5 hasta 60 minutos se realizó el ensayo de viabilidad por el método de MTT. Se observó una reducción significativa (*) de la viabilidad de los hepatocitos como consecuencia de la interacción de la lectina a los 5, 15 y 30 minutos de interacción. A los 60 min de iniciada la interacción el efecto citotóxico no fue mucho mayor al observado en los otros tiempos de incubación (Figura 5).

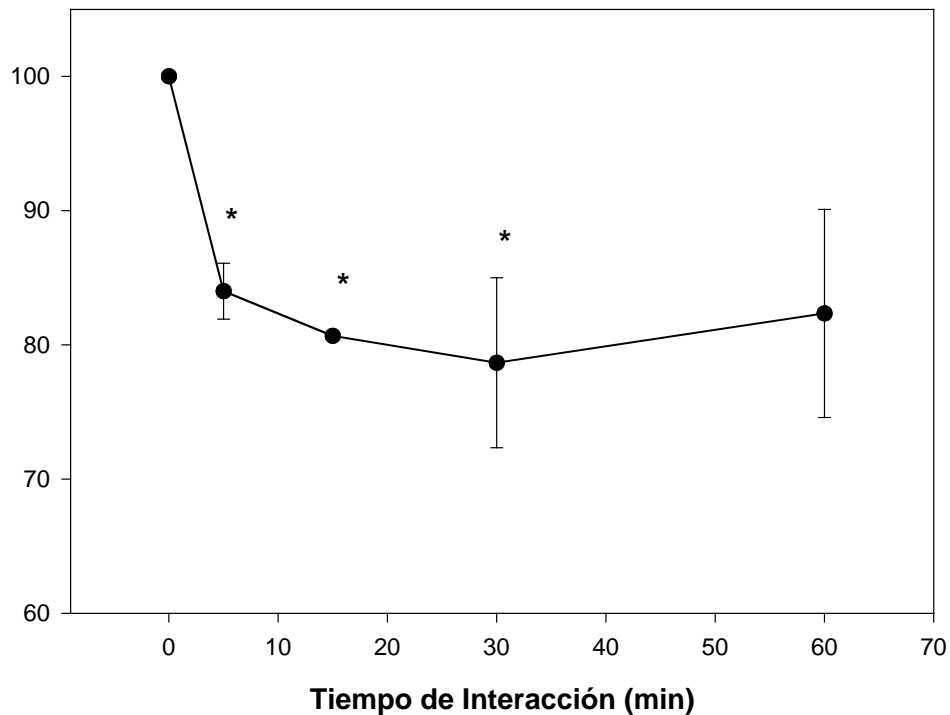


Figura 5.- Efecto citotóxico directo de la lectina sobre los hepatocitos de hámster. Los hepatocitos de hámster se incubaron con la lectina Gal/GalNAc (4 μ g) durante diferentes tiempos y al final se determinó la viabilidad de los hepatocitos mediante ensayo con MTT. Hubo reducción significativa (*, $p < 0.05$) de la viabilidad de los hepatocitos como consecuencia de la interacción con la lectina purificada, a los 5, 15 y 30 minutos.

Anticuerpos IgG anti lectina inhiben el daño de los hepatocitos por *E histolytica*

Con el fin de establecer el papel de los anticuerpos en la adherencia de los trofozoítos a la capa de hepatocitos, los trofozoítos se incubaron durante cinco minutos con anticuerpos policlonales de conejo de la clase IgG anti lectina y enseguida se añadieron a la monocapa de hepatocitos. Después de incubar por 30 y 60 min, se realizó el ensayo de viabilidad de los hepatocitos. Como se observa (Figura 6), los anticuerpos IgG específicos inhibieron el daño de los hepatocitos. Por el contrario, la IgG de un animal no inmunizado no tuvo el mismo efecto.

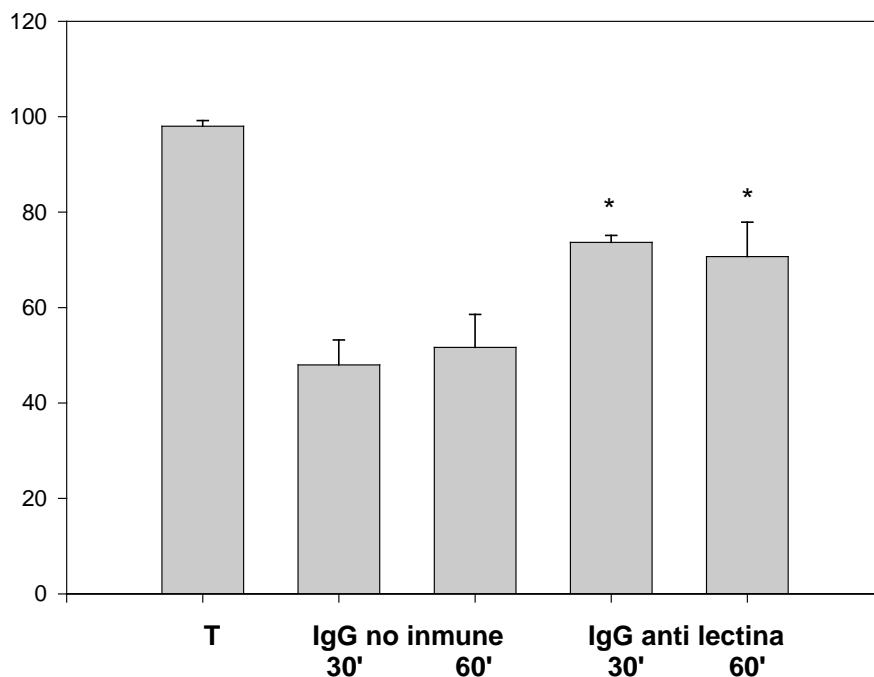


Figura 6.- Anticuerpos IgG anti lectina inhiben la acción citotóxica de las amibas sobre los hepatocitos. Los anticuerpos IgG anti lectina (25 µg/ml) inhibieron significativamente (*, p< 0.05) la adhesión de los trofozoítos a los hepatocitos, a partir de los 30 minutos de incubación.

Los anticuerpos anti lectina y el complemento no aumentan el daño de los hepatocitos

Los trofozoítos se hicieron interaccionar por 15 minutos con la IgG anti lectina y posteriormente se añadieron a la monocapa de hepatocitos junto con el complemento, después de incubar 30 minutos se midió la viabilidad. No se observó citotoxicidad mediada por anticuerpos ya que no se incrementó el daño de los hepatocitos (Figura 7). En forma similar cuando se incubaron los hepatocitos con lectina y posteriormente se adicionaron los anticuerpos IgG anti lectina y complemento, no se incremento el daño de los hepatocitos (Figura 8).

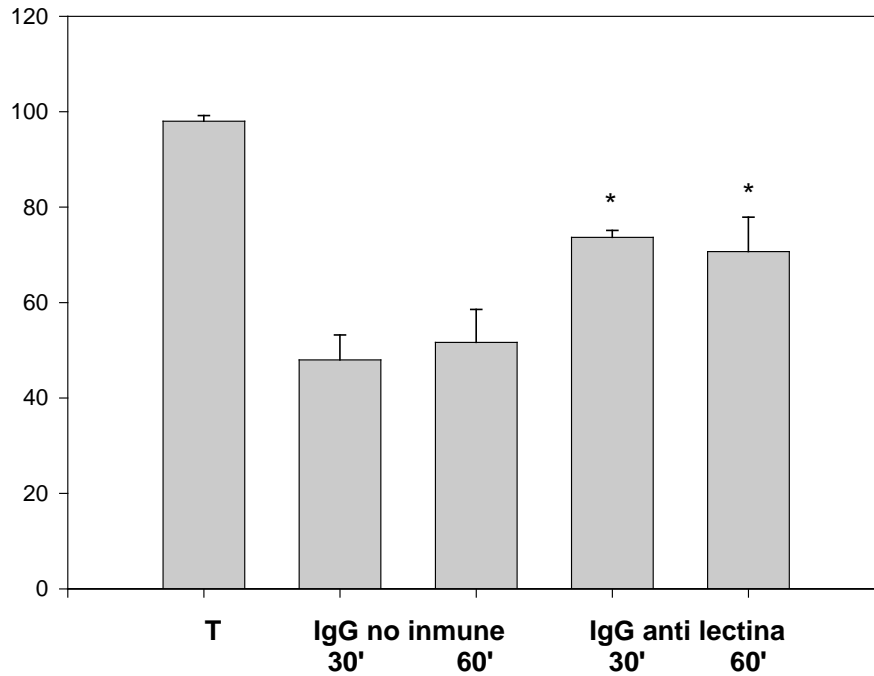


Figura 7. Los anticuerpos anti lectina y el complemento no dañan a los hepatocitos previamente incubados con trofozoítos. Los hepatocitos y las amibas se hicieron interaccionar durante 15 minutos a una relación de 8:1, transcurrido este tiempo se adicionó la IgG anti lectina (25-50µg) y complemento (5 y 50µg). No hubo efecto significativo de los anticuerpos y complemento sobre la viabilidad de los hepatocitos.

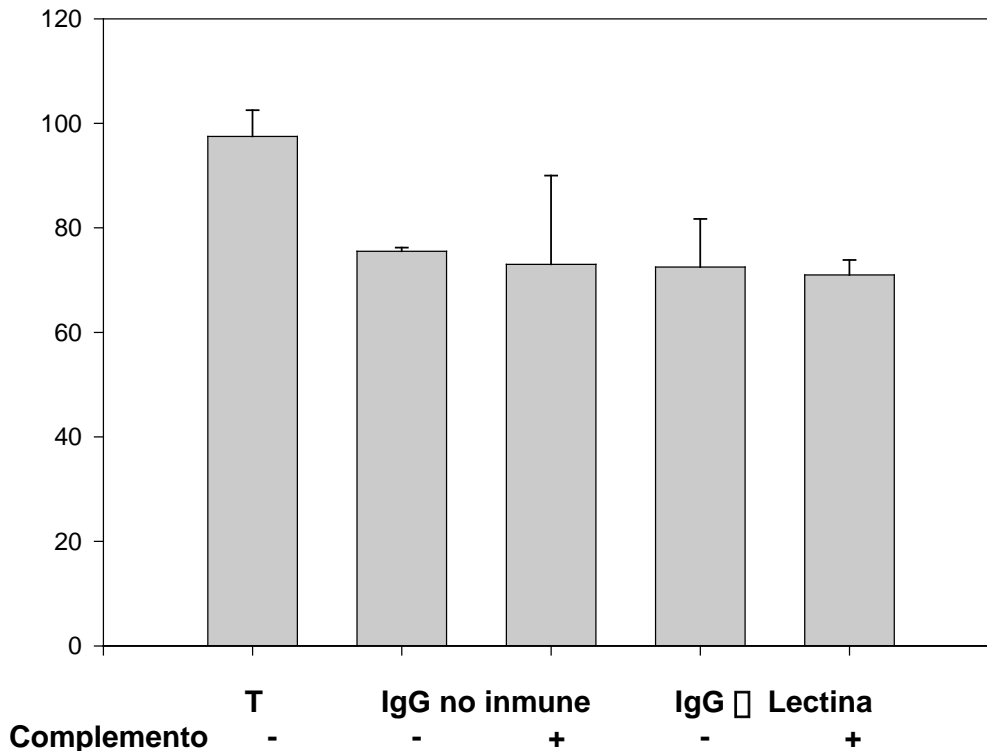


Figura 8. Los anticuerpos anti lectina y el complemento no dañan a los hepatocitos previamente incubados con lectina. La lectina (10 µg) se hizo interaccionar con los hepatocitos durante 15 minutos a 37°C. Después se adicionan los anticuerpos anti lectina (50 µg) y complemento. Después de incubar 30 minutos se midió la viabilidad. No hubo efecto significativo de los anticuerpos y complemento sobre la viabilidad de los hepatocitos.

La lactosa inhibe el daño de los hepatocitos causado por trofozoítos de *E. histolytica*

Para analizar el efecto de la inhibición de la función de la lectina amibiana por carbohidratos, los trofozoítos se incubaron con diferentes concentraciones de carbohidratos (NacGlu, manosa, galactosa, melobiosa, NAcGal y lactosa) y posteriormente se agregaron a la monocapa de hepatocitos de hámster. La viabilidad de los hepatocitos disminuyó aproximadamente en un 55% a los 30 minutos de interacción con trofozoítos no preincubados con carbohidratos (Figura 9). Cuando las amibas fueron preincubadas con los carbohidratos NacGlucosamina, manosa, galactosa y melobiosa a la concentración de 50mM hubo un ligero restablecimiento de la viabilidad de los hepatocitos, ya que aproximadamente un 64-68% de los hepatocitos permanecieron viables a los 30 minutos de interacción. Sin embargo, solamente la NAcGal a concentración de 200mM y la lactosa a concentraciones de 100 y 200 mM fueron capaces de bloquear de manera significativa el daño de los hepatocitos de hámster, ya que la viabilidad de los mismos se incremento a 80 y 100% respectivamente.

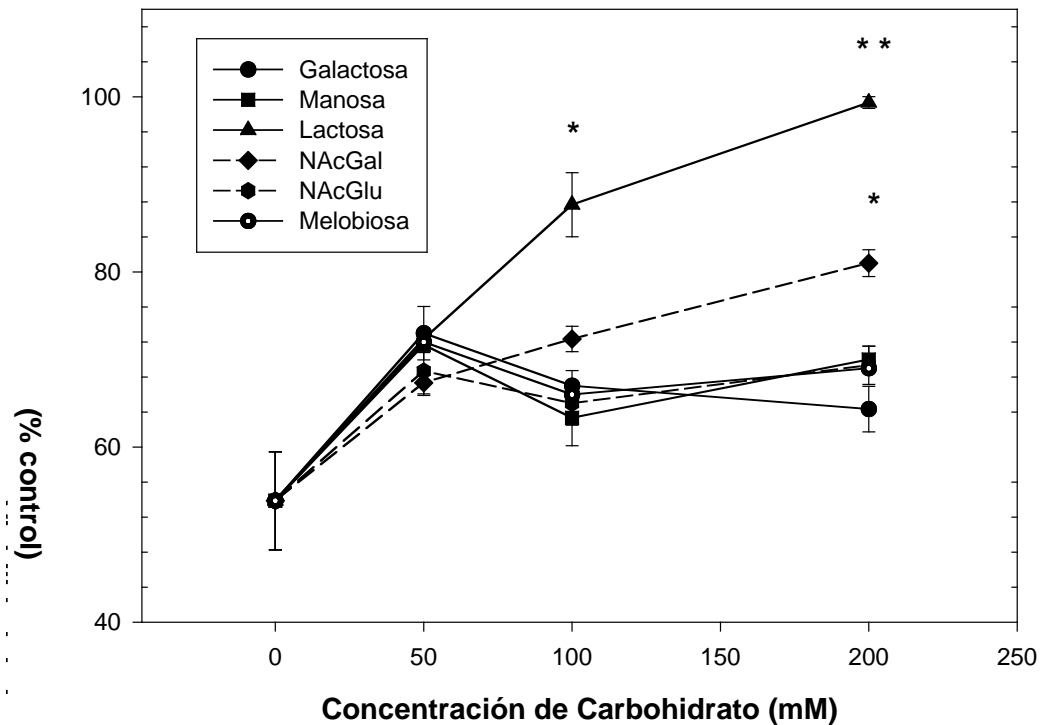


Figura 9.-Inhibición por azúcares del daño de los hepatocitos. Las amibas se incubaron con diferentes concentraciones de varios azúcares. Posteriormente las amibas se añadieron al cultivo de hepatocitos y transcurridos 30 minutos de incubación se realizó el ensayo de viabilidad empleando MTT. Los resultados se muestran como la media y la desviación estándar (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

DISCUSIÓN

Nuestro trabajo demuestra la unión de la lectina Gal/GalNAc de *Entamoeba histolytica* a el hepatocito, el efecto que provoca la unión de la lectina en el hepatocito y el papel que desempeñan los anticuerpos anti-lectina Gal/GalNAc y carbohidratos sobre el evento de adhesión.

Mediante inmunocitoquímica observamos la presencia de la lectina Gal/GalNAc sobre la superficie y dentro de los hepatocitos de hámster provenientes de cultivo primario, sugiriéndonos que las células parenquimatosas expresan glicoproteínas que son capaces de unir a la lectina Gal/GalNAc y que la molécula puede ser introducida al citoplasma de la célula. La lectina se distribuyó de manera heterogénea, en algunos hepatocitos se observó un intenso marcaje mientras que en otros la lectina no se unió. Esto sugiere que existen diferencias en la expresión de glicoproteínas en el hepatocito a las cuales se puede unir la lectina Gal/GalNAc. Los hepatocitos presentan diferencias morfofuncionales y bioquímicas dependiendo de su localización zonal en el lóbulo hepático (zona periportal, zona media y zona pericentral) (25), por tanto no es extraño que observemos diferencias con respecto a la unión de la lectina Gal/GalNAc en el hepatocito. El patrón de distribución de la lectina purificada en el hepatocito también se presentó de manera diferencial, la lectina une algunas áreas del hepatocito y en forma de parches sobre la superficie hepática, esto pudiera estar relacionado con la expresión diferencial de glicoproteínas en los diferentes dominios de la membrana plasmática del

hepatocito (dominio lateral, perisinusoidal y canalicular) (25). Los hepatocitos localizados a cierta distancia de los trofozoítos de *E. histolytica* mostraron también marca a la lectina lo que apoya la idea de que exista un proceso de secreción y difusión de la lectina hacia la vecindad del parásito. Nuestros resultados se correlacionan sólo en parte con aquellos reportados por Leroy y cols. (26) en donde de manera indirecta mediante el uso del anticuerpo monoclonal CD6 dirigido contra un antígeno amibiano, detectan la unión del antígeno a la superficie lateral de células epiteliales, no obstante esto, los anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra la lectina fueron incapaces de marcar las células epiteliales. El mecanismo molecular por el que la lectina se une y difunde hacia el hepatocito no es claro a la fecha.

Nuestros resultados nos indican que la unión de la lectina por las células blanco podría estar relacionada con el efecto citopático del parásito, dado que un importante número de hepatocitos que unen a la lectina Gal/GalNAc muestran cambios morfológicos sugestivos de daño celular, presentan vacuolización, pérdida de arquitectura, redondeamiento y presencia de núcleos picnóticos. El daño mediado por lectinas a las células blanco se ha mencionado con anterioridad en la literatura (27, 28, 29, 30, 31), donde las lectinas participan en el reconocimiento y adhesión de la célula blanco, esta adhesión es un prerrequisito para la colonización e invasión de las células del huésped.

Los resultados observados a nivel de microscopia de luz de las interacciones de hepatocitos con los trofozoítos o la lectina purificada correlacionan con los ensayos de citotoxicidad, es decir, durante la interacción de las amibas con el cultivo primario observamos una disminución en la viabilidad de la monocapa de hepatocitos. En la interacción de la amiba con los hepatocitos hubo una disminución abrupta del porcentaje de reducción del MTT, la viabilidad disminuyó más del 60% desde los primeros minutos de interacción, esto correlaciona con reportes en donde se muestra el daño ocasionado por *E. histolytica* sobre diferentes monocapas de células (32, 33). La interacción de la lectina purificada con el cultivo de hepatocitos indujo una disminución en el porcentaje de células hepáticas viables (25%) esto se relacionó de manera directa con las observaciones morfológicas realizadas por microscopia de luz en donde el número de células dañadas fue menor que el observado cuando las interacciones se realizaron con trofozoítos íntegros. La variabilidad observada en el daño inducido a los hepatocitos por las amibas y la lectina purificada puede deberse a que la lectina Gal/GalNAc participe junto con otras moléculas amibianas en el efecto citotóxico observado en la célula blanco. No obstante esto, la captura de la lectina Gal/GalNAc constituye un importante componente del efecto citopático del parásito.

Recientemente se utilizaron inhibidores específicos para demostrar la participación de tres tipos de moléculas en el efecto citotóxico de *E. histolytica* sobre monocapas de células MDCK (34), el único inhibidor que bloquea la pérdida de resistencia transepitelial provocada por la amiba fue la galactosa, lo que sugiere que la lectina Gal/GalNAc constituye un importante factor de citotoxicidad. También se ha mencionado que la lectina Gal/GalNAc participa en el proceso citolítico, debido a que durante la incubación de la lectina con las células CHO se observa un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} similar a la que induce la amiba, además, al adicionar D-galactosa se bloquea completamente el flujo de Ca^{2+} y el evento citolítico (35). Finalmente, dentro de las alteraciones morfológicas que se observaron en el cultivo primario de hepatocitos que fue interaccionado con trofozoítos y lectina, se manifestó la presencia de núcleos picnóticos, lo que es sugestivo de un fenómeno apoptótico. Se ha mencionado que *E. histolytica* es capaz de inducir muerte celular programada. En el modelo de absceso hepático amibiano producido en ratones con inmuno deficiencia severa combinada (SCID), la apoptosis inducida por *E. histolytica* no requiere del ligando Fas/Fas, ni del TNF α (36). Así mismo, se ha observado que un inhibidor de caspasas en el modelo de absceso hepático amibiano en el ratón SCID reduce de manera significativa el tamaño de los

abscesos hepáticos lo que indica que en la formación del absceso hepático amibiano la apoptosis juega un papel significativo (37).

Con respecto a la lectina Gal/GalNAc de *E. histolytica* se observó que la destrucción de la línea celular mieloide murina (FDC-P1) por trofozoítos de *E. histolytica* es dependiente de contacto, con inducción de muerte apoptótica, y que este proceso es inhibido con galactosa lo que sugiere un posible papel de la lectina Gal/GalNAc durante dicho proceso (38).

Con la finalidad de establecer la participación de la lectina Gal/GalNAc durante el evento de adhesión de *E. histolytica* y el daño provocado en el cultivo primario de hepatocitos de hámster se realizaron ensayos de bloqueo de citotoxicidad utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra la lectina, el bloqueo de la adhesión y el daño se midió de manera indirecta mediante ensayos de citotoxicidad. La preincubación de las amibas con IgG anti lectina Gal/GalNAc bloqueó el proceso de daño y permitió un incremento significativo de la viabilidad de los hepatocitos, lo que nos sugiere que al igual que en otros ensayos de interacción *in vitro*, la lectina Gal/GalNAc participa de manera importante en el evento de adhesión y en consecuencia en el daño ocasionado por el parásito. Se sabe que los anticuerpos monoclonales C12 y 1G7 anti lectina Gal/GalNAc bloquean la adherencia de trofozoítos de *E. histolytica* a células de ovario de hámster chino (CHO) y a mucinas colónicas, en tanto que el anticuerpo monoclonal H85 únicamente inhibe la adhesión a células CHO lo que nos muestra diferencias en la unión de la lectina Gal/GalNAc dependiendo del tipo celular (39). Trofozoítos de *E. histolytica* preincubados con anticuerpos monoclonales anti lectina Gal/GalNAc fueron incubados con células CHO marcadas radioactivamente (^{51}Cr), los anticuerpos bloquearon la adhesión y la citotoxicidad hacia las células CHO (40). Así mismo, fragmentos del gen que codifica para la subunidad pesada de la lectina se expresaron como proteínas recombinantes y se reaccionaron con anticuerpos monoclonales anti lectina, los anticuerpos reconocieron diferentes epítomos de la subunidad pesada y tuvieron diversos efectos sobre la adhesión y citotoxicidad; los anticuerpos que reaccionan con el dominio rico en cisteína de la lectina, inhibieron la adherencia, citotoxicidad y redujeron la resistencia al componente C5b-9 del complemento (41). Nuestros resultados y los obtenidos en estudios previos muestran la relevante participación de la lectina Gal/GalNAc durante el evento de adhesión y daño ocasionado por los trofozoítos de *E. histolytica*.

Por lo que respecta al posible papel de los anticuerpos y el complemento en el daño de los hepatocitos, al parecer tanto los anticuerpos anti lectina como el complemento no incrementaron el daño de los hepatocitos; sin embargo, es necesario establecer si los anticuerpos dirigidos contra otros epítomos de la lectina pueden evitar la destrucción de los hepatocitos.

Por otro lado, en el bloqueo de la adhesión mediado por carbohidratos, observamos que únicamente la lactosa a concentración de 100mM fue capaz de bloquear de manera significativa el evento de adhesión y, en consecuencia, reducir el daño a los hepatocitos, en tanto que a concentración de 200mM, NAcGal y lactosa bloquearon significativamente la unión de la lectina impidiendo el daño celular, la viabilidad se incrementó en un 80 y 100% respectivamente. Aún cuando se ha mencionado que la adhesión *in vitro* de la amiba es principalmente inhibida por galactosa y N-acetil-D-galactosamina en el caso del cultivo primario de hepatocitos de hámster NAcGal únicamente bloqueó el evento de adhesión a 200mM, en tanto que lactosa fue capaz de inhibir de manera importante la adhesión, nuestros datos correlacionan con aquellos reportados por Saffer y Petri (42) en donde observan que la lactosa y la N-acetil-lactosamina inhiben casi completamente la adhesión de la amiba a células CHO, estos carbohidratos fueron los inhibidores más potentes incluso que la galactosa durante la adhesión de trofozoítos a células CHO. Así mismo Li y cols (13) compararon la adhesión de trofozoítos con un panel de células CHO

mutantes, que presentaban patrones de glicosilación alterados y cuyos resultados mostraron que N-acetil-lactosamina fue el más efectivo; la lactosa a 50mM también inhibió el fenómeno de adhesión. Al interactuar amibas con monocapas de una línea de células de carcinoma colónico humano (HT-29), N-acetil-lactosamina fue el inhibidor más potente durante la adhesión, ya que concentraciones de 10mM lograron bloquear la adhesión en un 98% (43). Aún cuando se ha mencionado que la Galactosa y N-acetil galactosamina son los carbohidratos más efectivos para bloquear la adhesión hacia los diferentes tipos celulares (11,44,45,5), en el caso del hepatocito que es la célula blanco en el absceso hepático amibiano, la lactosa es mucho más eficiente en bloquear la adhesión de la amiba mediada por la lectina Gal/GalNAc. Las diferencias observadas en la adhesión de la amiba a las diferentes líneas celulares pueden deberse a diferencias en la estructura y expresión de los carbohidratos.

Con todos estos datos podemos sugerir que la lectina de unión a galactosa/N acetil D-galactosamina es una molécula que participa de manera muy importante en la patogénesis del absceso hepático amibiano. Los azúcares lactosa y NAcGal fueron capaces de inhibir el evento de adhesión de la amiba y como consecuencia disminuir el daño en el cultivo primario de hepatocitos de hámster. Nuestros estudios con los anticuerpos anti lectina de 260 kDa mas el complemento al parecer no participan de manera importante en el bloqueo de la adhesión a la célula blanco, estos resultados aunque preliminares deben realizarse con epítopes de la lectina que inhiban el evento de adhesión y por lo tanto eviten la destrucción de los hepatocitos por la lectina.

AGRADECIMIENTOS

Al Sra. Silvia Galindo y Mireya Sánchez Palomero por la asistencia técnica prestada para la realización del presente trabajo.

REFERENCIAS

1. Eaton, R. D., Meerovitch, E., Costerton J. W., "The functional morphology of pathogenicity in *Entamoeba histolytica*", *Ann Trop Med Par*, Inglaterra, vol. 64, pp. 299-304, 1970.
2. García-Rivera, T., et. al., "Aislamiento de clones de *Entamoeba histolytica* deficientes en adhesión a eritrocitos humanos", *Arch Invest Med*, México, vol. 13, pp. 129-136, 1982.
3. Kobilier, D., Mirelman, D., "Lectin Activity In *Entamoeba histolytica* trophozoites", *Infect Immun*, Estados Unidos, vol. 29, pp. 221- 225, 1980.
4. Orozco, E. A., et. al., "Las interacciones entre lectina y receptor median la adherencia de *Entamoeba histolytica* a células epiteliales. Relación de la adhesión con la virulencia de las cepas", *Arch Invest Med*, México, vol. 13, pp. 159-167, 1982.
5. Ravdin, J. I., et al., "N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. I. Partial purification and relation to amoebic virulence in vitro", *J Infect Dis*, Estados Unidos, vol. 151, pp. 804-815, 1985.
6. Petri, W. A., et. al., "Isolation of the Galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *E. histolytica*", *J Clin Invest*, Estados Unidos, vol. 80, pp. 1238-1244, 1987.

7. Rosales-Encina, J. L., et. al., "Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*", *J Infect Dis*, Estados Unidos, vol. 156, núm. 5, pp. 790-797, 1987.
8. Meza, I., et. al., "Use of antibodies to characterize a 220-kilodalton surface protein from *Entamoeba histolytica*", *J Infect Dis*, Estados Unidos, vol. 156, núm 5, pp. 798-805, 1987.
9. Arroyo, R., Orozco, E., "Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin". *Mol Biochem Parasitol*, Holanda, vol. 23, pp. 151-158, 1987.
10. Rodríguez, M. A., et. al., "*Entamoeba histolytica*: molecules involved in target cell-parasite relationship", *Mol Biochem Par*, Inglaterra, vol. 37, pp.87-100, 1989.
11. Ravdin, J. I., Guerrant, R. L., "The role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human red blood cells", *J Clin Invest*, Estados Unidos, vol. 68, pp.1305-1313, 1981.
12. Cano-Mancera, R., López-Revilla, R., "Inhibition of the adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes by carbohydrates", *Parasitol. Res*, Alemania, vol. 74, pp. 18-22, 1987.
13. Li, E., Becker, A., Stanley, S. L., "Use of chinese hamster ovary cells with altered glycosylation patterns to define the carbohydrate specificity of *Entamoeba histolytica* adhesion", *J Exp Med*, Estados Unidos, vol. 167, pp. 1725-1730, 1988.
14. McCoy, J. J., Mann, B. J., Petri, W. A. Jr., "Adherence and Cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or How Lectins Let Parasites Stick Around", *Infect Immun*, Estados Unidos, vol. 62, núm. 8, pp. 3045-3050, 1994.
15. Maddison, S. E., Kagan, I. G., Norman, G., "Reactivity of human immunoglobulin in amebiasis", *J Immunol*, Estados Unidos, vol. 100, pp. 217-226, 1968.
16. Lee, E., Palacios, O., Kretschmer, R., "Localización del anticuerpo antiamebiano en las inmunoglobulinas del suero humano", *Arch Invest Med*, México, vol. 1, pp. s101-s106, 1970.
17. Osinsaya, J. D. S., Warhust, D. C., "Specific anti-amoebic immunoglobulins and the cellulose acetate precipitin test in *Entamoeba histolytica* infection", *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, Inglaterra, vol. 74, pp. 605-608, 1980.
18. Harris, W. G., Friedman, M. J., Bray, R. J., "Serial measurement of total and parasite-specific IgE in an African population infected with *Entamoeba histolytica*", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, Inglaterra, vol. 72, pp. 427-430, 1978.
19. Revoltella, R., et. al., "Parasite-reactive serum IgE antibodies in African populations relation to intestinal parasite load", *Int Arch Allergy Appl Immunol*, Suiza vol. 62, pp. 23-33, 1980.
20. Krupp, I. M., "Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis", *Amer J Trop Med Hyg*, Inglaterra, vol. 19, pp. 57-62, 1970.
21. Norman, L., Gold, D., Kagan, I. K., "The serologic response of hamsters to experimental liver inoculations with *Entamoeba histolytica* as measured by

- indirect hem agglutination test and enzyme linked immunosorbent assay", *Am J Trop Med Hyg*, Estados Unidos, vol. 28, pp. 198-205, 1979.
22. Petri, W. A. Jr., Ravdin, J. I., "Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with the galactose-specific adherence lectin of *Entamoeba histolytica*", *Infect Immun*, Estados Unidos, vol. 59, núm. 1, pp. 97-101, 1991.
 23. Kotter y cols, 1997.
 24. Pacheco, J., et. al., "In vitro and in vivo interaction of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin with various target cells: an immunocytochemical analysis" *Parasitol Int*, Japon, vol. 53, núm 1, p. 35, 2004.
 25. Arias, I., et. al., "The liver biology and pathobiology", segunda ed., Estados Unidos, Editorial Raven Press, pp. 3-683, 1988.
 26. Leroy, A., et al., "Contact-dependent transfer of the galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica* to the lateral surface of enterocytes in culture", *Infect Immun*, Estados Unidos, vol. 63, núm. 11, pp. 4253-4260, 1995.
 27. Jungery, M., et. al., "A lectin-like receptor is involved in invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*", *Proc Natl Acad Sci*, Estados Unidos, vol. 80, pp. 1018-1022, 1983.
 28. Snary, D., "Receptors and recognition mechanisms of *Trypanosoma cruzi*", *Trans Roy Soc Med Hyg*, Inglaterra, vol. 79, pp. 587-590, 1985.
 29. Lev, B, et. al., "Lectin activation in *Giardia lamblia* by host protease: a novel host-parasite interaction", *Science*, Estados Unidos, vol. 232, pp. 71-73, 1986.
 30. Farthing, M. J. G., Pereira, M. E. A., Keusch, G. T., "Description and characterization of a surface lectin from *Giardia lamblia*", *Infect Immun*, Estados Unidos, vol. 51, núm. 2, pp. 661-667, 1986.
 31. Ortega-Barria, E., Boothroyd, J. C., "A *Toxoplasma* lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection", *J Biol Chem*, Estados Unidos, vol. 274, núm. 3, pp. 1267-1276, 1999.
 32. Martínez-Palomo, A., et. al., "Structural basis of the cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica*", *J Protozool*, Estados Unidos, vol. 32, pp. 166-175, 1985.
 33. Li, E., et. al., "*Entamoeba histolytica* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells", *Infect Immun*, Estados Unidos, vol. 62, núm. 11, pp. 5112-5119, 1994.
 34. López-Vancell, R., Montfort, I., Pérez-Tamayo, R., "Galactose-specific adhesin and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*", *Parasitol Res*, Alemania, vol. 86, pp. 226-231, 2000.
 35. Ravdin, J. I., et al., "Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*", *Infect Immun*, Estados Unidos, vol. 56, pp. 1505-1512, 1988.
 36. Seydel, K. L., Stanley, Jr. S. L., "*Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abscess by non-Fas-dependent, non-Tumor Necrosis Factor Alpha-

dependent pathway of apoptosis", *Infect Immun*, Estados Unidos, vol. 66, núm. 6, pp. 2980-2983, 1998.

37. Yan, Le., Stanley, Jr. S. L., "Blockade of caspases inhibits amebic liver abscess formation in a mouse model disease", *Infect Immun*, Estados Unidos, vol. 69, núm. 12, pp. 7911-7914, 2001.
38. Ragland, B. D., et. al., "*Entamoeba histolytica*: target cells killed by trophozoites undergo DNA fragmentation which is not blocked by Bcl-2", *Exp Parasitol*, Estados Unidos, vol. 79, núm. 3, pp. 460-467, 1994.
39. Petri, W. A. Jr., et. al., "Monoclonal antibodies directed against the galactose-binding lectin of *Entamoeba histolytica* enhance adherence", *J Immunol*, Estados Unidos, vol. 144, núm. 12, pp. 4803-4809, 1990
40. Saffer, L. D., Petri, W. A. Jr., "Role of the galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells", *Infect Immun*, vol. 59, núm. 12, pp. 4681-4683, 1991.
41. Mann, B. J., et. al., "Neutralizing monoclonal antibody epitopes of the *Entamoeba histolytica* galactose adhesin map to the cysteine-rich extracellular domain of the 170 kilodalton subunit", *Infect Immun*, Estados Unidos, vol. 61, núm. 5 pp. 1772-1778, 1993.
42. Saffer, L. D., Petri, W. A. Jr., "*Entamoeba histolytica*: Recognition of α - and β -galactose by the 260-kDa adherence lectin", *Exp Parasitol*, Estados Unidos, vol. 72, pp. 106-108, 1991.
43. Burchard, G. D., Prange, G., Mirelman, D., "Interaction between trophozoites of *Entamoeba histolytica* and the human intestinal cell line HT-29 in the presence or absence of leukocytes", *Parasitol Res*, Alemania, vol. 79, pp. 140-145, 1993.
44. Bracha, R., Mirelman, D., "Adherence and ingestion of *Escherichia coli* serotype O55 by trophozoites of *Entamoeba histolytica*", *Infect Immun*, Estados Unidos, vol. 40, pp. 882-887, 1983.
45. Bracha, R., Mirelman, D., "Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerophilic conditions, and metronidazole", *J Exp Med*, Estados Unidos, vol. 160, pp. 353-368, 1984.

“Validación de la medición de retinol y tocoferol por HPLC en muestras tomadas en gotas de sangre sobre papel filtro (GSS) y su comparación con sangre venosa y sangre capilar”

Irene Montalvo Velarde
Investigadora. Escuela de Ciencias Químicas
Universidad La Salle.
E-mail: imontal@ci.ulsal.mx

Mardya López Alarcón
Unidad de Investigación en Nutrición
Instituto Mexicano del Seguro Social.

René Casique Salvatierra
Escuela de Ciencias Químicas
Universidad La Salle.

[Recibido : Agosto de 2005. Aceptado: Octubre de 2005](#)

RESUMEN

Los valores séricos son el indicador comúnmente usado para conocer el estado de vitaminas A y E. Desafortunadamente, su uso es impráctico en evaluaciones poblacionales, debido a que involucra la toma de sangre venosa, centrifugación y almacenamiento en congelación antes de su análisis. El objetivo de este estudio fue validar el uso de gotas de sangre seca (**GSS**) para la evaluación de vitaminas A y E, comparándolas con el retinol y tocoferol en suero venoso y capilar. Muestras de sangre venosa (**SV**) y capilar (**SC**) y **GSS** capilar (**GSSC**) se tomaron simultáneamente de 27 donadores adultos sanos. Las muestras de sangre, tanto de GSS como de suero, se prepararon y se mantuvieron a -70°C hasta su análisis por HPLC. Las diferencias entre las muestras individuales fueron calculadas por análisis de varianza (ANOVA). El Coeficiente de Correlación de Pearson se calculó para estimar el grado de varianza de las concentraciones tanto de retinol como de tocoferol de las diferentes muestras. Las correlaciones para retinol fueron: $\text{SV/SC} = 0.89$; $\text{SV/GSSC} = 0.85$ y $\text{SC/GSSC} = 0.88$; para tocoferol fueron: $\text{SV/SC} = 0.97$; $\text{SV/GSSC} = 0.94$ y $\text{SC/GSSC} = 0.96$. El uso de esta nueva forma de muestra para evaluación de vitaminas A y E permitirá el acceso a poblaciones previamente inaccesibles.

Palabras Clave: retinol, tocoferol, gota de sangre seca, punción venosa.

ABSTRACT

The most commonly used indicator to know about vitamins A and E status is serum values. Unfortunately, its use is impractical for national surveys because it involves collection of venous blood, centrifugation and frozen storage before analysis. The objective of this study was to validate the use of dried blood spots (**DBS**) for vitamin A and E assessment by comparing it with venous and capillary serum retinol and tocopherol. Venous (**VB**), capillary blood (**CB**) and capillary **DBS (CDBS)** specimens were obtained simultaneously from 27 healthy adult volunteers. From each blood specimen, both DBS and liquid serum were prepared, and maintained at -70°C until HPLC analysis. The differences within individuals were estimated by analysis of variance (ANOVA). The R^2 value (Square of the Pearson's correlation coefficient) was calculated to estimate the degree of variance for one retinol or tocopherol concentration explained by the other. Correlations for retinol were: $\text{VB}/\text{CB} = 0.89$; $\text{VB}/\text{CDBS} = 0.85$ and $\text{CB}/\text{CDBS} = 0.88$; for tocopherol were: $\text{VB}/\text{CB} = 0.97$; $\text{VB}/\text{CDBS} = 0.94$ and $\text{CB}/\text{CDBS} = 0.96$. The use of this new sample matrix for vitamin A and E assessment will allow access to previously unavailable populations.

Key Words: Retinol, tocopherol, dry blood spot, venous puncture.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El equilibrio nutricional no es fácil de conseguir. Las desordenadas pautas alimentarias de la vida actual rompen con frecuencia ese equilibrio y ocasionan a menudo deficiencias de vitaminas (1).

Está comprobado que la actividad física y el estrés, asociados a motivos físicos o psíquicos, condicionan un aumento en las necesidades de algunos nutrimentos. La actividad diaria intensa o una situación de estrés hacen que la persona cambie sus hábitos de alimentación, fume más o consuma mayor cantidad de alcohol, por lo que la demanda de las vitaminas pueden hacerse mayores (1).

La mala nutrición que resulta del consumo deficiente de alimentos o nutrimentos específicos, se conoce genéricamente como desnutrición. La desnutrición tiene como causas biológicas inmediatas la ingestión dietética inadecuada y la elevada incidencia de enfermedades infecciosas y parasitarias que aumentan las necesidades de algunos nutrimentos, disminuyen su absorción o provocan pérdidas de micronutrimentos. La desnutrición afecta principalmente a los niños durante los primeros tres años de vida, aunque la deficiencia de varios micronutrimentos también se presenta durante la edad escolar y en mujeres en edad fértil (2).

La desnutrición provoca defectos en funciones como el crecimiento y el desarrollo psicomotor, con mayor riesgo de morbilidad y mortalidad y con efectos adversos a largo plazo (3,4).

Si antes se pensaba que el aporte de los micronutrimentos era fundamental para prevenir las enfermedades que su carencia podría generar, ahora se sabe que estos micronutrimentos desempeñan un importante papel en la prevención de otras enfermedades, como la patología cardiovascular y el cáncer, e incluso para retrasar el envejecimiento (1).

Dentro de las vitaminas liposolubles, la vitamina A participa en la visión, en el crecimiento, en el desarrollo de los huesos, en el mantenimiento del tejido epitelial (piel, pelo, uñas, mucosas respiratorias y de los ojos, etc.), y en los procesos inmunitarios para evitar las infecciones. La deficiencia de esta vitamina puede ocasionar desde ceguera nocturna hasta Xeroftalmia ocasionando ceguera permanente (5).

La vitamina E, también llamada Tocoferol es importante para la reproducción normal, el desarrollo muscular y la cicatrización de las llagas, tiene una acción antioxidante y ayuda a proteger las membranas de los glóbulos rojos (6).

Su deficiencia ocasiona esterilidad en machos de algunas especies y abortos espontáneos y resorción de fetos en hembras, degeneración muscular, anemias y lesiones hepáticas y renales. Además guarda relación con el proceso de envejecimiento. Se almacena en el organismo durante largos periodos de tiempo, así que no es frecuente tener deficiencias importantes. Se considera una sustancia no tóxica excepto en los pacientes con hipotensión y cardiopatía reumática crónica (6).

En la Encuesta Nacional de Nutrición 1999 (7), recientemente publicada, las principales deficiencias de micronutrientes tanto en niños preescolares y escolares y en mujeres embarazadas se encontraron en Fe y Zn; las deficiencias de vitamina A (retinol) y Vitamina E (tocoferol) y ácido fólico, se encontraron principalmente en mujeres embarazadas.

Sin embargo, la deficiencia de retinol en países asiáticos y africanos es verdaderamente importante, con las manifestaciones graves de su deficiencia como xeroftalmia juvenil, queratomalacia, manchas de Bitot, ceguera nocturna o ceguera total, permitiendo que los niños y mujeres jóvenes sean más vulnerables a la enfermedad, ya que cerca de 150 millones de niños tienen deficiencia subclínica de vitamina A (8).

En cuanto a la deficiencia de tocoferol no existe suficiente información que demuestre que es un problema grave de salud pública, sin embargo, dada la importancia que tiene como antioxidante dentro de las funciones del organismo, su estudio se justifica plenamente.

El conocimiento de las deficiencias de micronutrientes en poblaciones, permite la intervención de suplementos que mejoren este estado, y por lo tanto, el buen desarrollo de los individuos.

El análisis convencional de retinol y tocoferol requiere de muestras de sangre venosa a las que posteriormente se separa el suero para hacer las determinaciones. Este procedimiento en estudios de campo es impráctico, ya que requiere de personal lo suficientemente entrenado para tomar muestras por punción venosa, una cantidad de sangre suficiente para obtener de ella la cantidad necesaria de suero para las determinaciones. El temor a las agujas, al riesgo de la transmisión y adquisición de enfermedades virales vía venosa (hepatitis crónica, SIDA) y/o creencias religiosas, son factores que pueden excluir a muchos de los participantes del estudio. Además, este método convencional requiere de electricidad para la centrifugación de las muestras y el almacenamiento de ellas en congelación inmediata para evitar su degradación y por consiguiente la pérdida de las vitaminas, subestimando su contenido. El transporte de las muestras hasta el lugar de análisis es otro problema grave, ya que también requiere de congelación, lo que en la mayoría de los casos resulta un proceso costoso (9).

La mayoría de estos obstáculos pueden evitarse analizando manchas o Gotas de Sangre Seca (GSS) en lugar de suero venoso; de esta manera, la colecta de las muestras puede ser mucho más fácil y menos invasiva. Este procedimiento que ha sido utilizado para el análisis de marcadores bioquímicos como en la detección de fenilcetonuria en los recién nacidos, no requiere de agujas, de personal entrenado para la toma de sangre, y el potencial de transmisión de enfermedades es mínimo; además, permite el acceso a poblaciones remotas. Una vez que la sangre obtenida por punción de un dedo o del talón es depositada en los papeles filtro debidamente marcados, su

transporte y almacenamiento hasta el laboratorio de análisis es fácil, ya que puede no requerir temperaturas bajo cero, con lo que se reduce importantemente su costo (10).

O'Broin y Maldonado (11,12), demostraron que el método GSS es una alternativa efectiva y viable para coleccionar muestras de sangre en estudios epidemiológicos, demostrando que este método fue adecuado para medición de ácido fólico en sangre.

La medición de vitamina A (retinol) en las GSS fue descrita previamente por Shi *et al*, (13) usando electroforesis capilar de alta resolución (HPCE) con detección de fluorescencia, acoplada con láser. Ma *et al*, (14) hicieron una modificación al método anterior de HPCE, optimizando las condiciones de separación y mejorando la confiabilidad del método, demostrando la estabilidad de la vitamina A en sangre seca coleccionada directamente de un dedo o del talón sobre el papel filtro.

Actualmente hay poca información disponible que haga la comparación entre las concentraciones de retinol de suero de vena y capilar y GSS (8, 9) y no hay información sobre el contenido de tocoferol en estas muestras.

Además de la facilidad en la toma de muestra, la instrumentación y la experiencia para la medición son absolutamente necesarias para la validez del método de cuantificación.

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

En países subdesarrollados, existen algunas barreras para el uso de sangre venosa en estudios de campo. En primer lugar, la colecciona de sangre venosa requiere de personal entrenado, en segundo lugar, debido a los tabúes locales, creencias culturales y religiosas y preocupaciones acerca de la transmisión de enfermedades, hay una resistencia a la toma de sangre venosa a través de agujas hipodérmicas. Una tercera barrera es el incremento en el riesgo de adquirir o transmitir enfermedades virales vía venosa, tales como hepatitis crónica y SIDA. Además, de que de la sangre se necesita separar el suero y esto requiere centrifugación y posteriormente transportarlo y almacenarlo en congelación hasta el lugar de análisis, lo cual es impracticable en ausencia de electricidad. La mayoría de estos obstáculos pueden evitarse analizando gotas de sangre seca (GSS) en lugar de sangre venosa, ya que no requiere punción venosa ni de almacenamiento y transporte inmediato a bajas temperaturas, lo que facilita en gran medida los estudios poblacionales de estas vitaminas.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar si el contenido de retinol y tocoferol en suero es igual en muestras provenientes de gotas de sangre seca sobre papel filtro (GSS), en sangre venosa y en sangre capilar del mismo individuo.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Establecer las condiciones de extracción óptima de la sangre tomada sobre el papel filtro para la determinación de retinol y tocoferol.
- 2.- Estandarizar las condiciones cromatográficas por HPLC para determinar en una misma corrida las dos vitaminas.
- 3.- Comparar el contenido obtenido de las dos vitaminas provenientes de los diferentes tipos de muestras obtenidas del mismo individuo.

METODOLOGÍA.

1.- Obtención de muestras

Se analizaron 27 voluntarios sanos a los que se les tomaron muestras de sangre de la siguiente forma:

Del mismo individuo se tomó en ayunas sangre venosa (aproximadamente 5 mL), en tubos sin anticoagulante. La sangre se centrifugó a 2,500 rpm durante 15 min para separar el suero, el cual se puso en criotubos y se congeló a -70°C hasta su análisis, (Muestra **SV**).

Se tomó también del mismo individuo una muestra de sangre capilar por punción del dedo de una mano con una lanceta (Microtainer con 2.2 mm de penetración), colocando 4 gotas de aproximadamente 50 µL cada una sobre papel filtro (papel filtro S & S # 903); una vez que son colocadas las gotas de sangre sobre el papel filtro, se deben poner en la oscuridad y dejarlas secar durante toda la noche, una vez secas, se colocan los papeles debidamente identificados en sobres de papel manila con una bolsita de secante para evitar el exceso de humedad y se guardaron a -70°C hasta el análisis de retinol y tocoferol (Muestra **GSSC**), del mismo dedo se pusieron 8 gotas de sangre en un microtubo sin anticoagulante (Microtainer # 5972), el cual se centrifugó para separar el suero, y se colocó en un tubo de plástico y se congeló a -70°C hasta el análisis de retinol y tocoferol (Muestra **SC**).

MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN.

a) Suero:

Se colocaron 100 µL de suero (**SV y SC**) en tubos de poliestireno con tapón de 5 ml de capacidad, se agregaron 100 µL de solución de ácido ascórbico al 0.1% y 100 µL de una solución de acetato de retinol (estándar interno) en etanol a una concentración de 20 µg/100ml y 200 µl de etanol.

A cada tubo se agregaron 500 µL de hexano, se taparon los tubos y se agitaron durante 1 min. con reloj en un Vortex. Para separar las fases, se centrifugaron los tubos a 2500 r.p.m. durante 10 minutos.

Se separó cuantitativamente la capa orgánica y paso a un vial de vidrio. A la capa acuosa se le hizo una segunda extracción con hexano en las mismas condiciones que a la anterior, y se juntaron las capas orgánicas.

El extracto de hexano se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno. El residuo se recuperó con 100 µL de etanol, conservando la muestra fría hasta la inyección al cromatógrafo.

Las muestras se colocaron en viales en el carrusel del automuestreador del cromatógrafo y se inyectaron 20 µl para la cuantificación de las vitaminas.

b) Gotas de sangre seca:

Para la determinación de las vitaminas en las manchas (**GSSC**) se hicieron 3 perforaciones, con una perforadora de 6.35 mm de diámetro, por cada perforación se asume que se tienen 12.5 µL de sangre, de acuerdo a un trabajo previo (12) en donde se

estandarizaron estas concentraciones, por lo que en total se tendrán 37.5 μ L de sangre para la determinación. Las perforaciones se colocaron en tubos de vidrio y se agregó 1 mL de buffer de fosfatos 150 mmol/L a pH de 7.8, conteniendo 0.5% de ascorbato de sodio y se extrajeron en un baño ultrasónico. Una vez extraída la sangre, se agregaron 100 μ L de estándar interno (acetato de retinol en concentración conocida) y 900 μ L de etanol que contenía hidroquinona como antioxidante (0.055%); de esta mezcla se hizo la extracción de las vitaminas de la misma forma que para el suero.

Para obtener el tiempo de máxima extracción de las vitaminas de las muestras GSS, se tomó sangre venosa de un solo individuo, se pusieron gotas sobre papel filtro en las mismas condiciones descritas anteriormente. Para la extracción se probaron 4 diferentes tiempos que fueron de 15, 30, 45 y 60 minutos de sonicación.

Todo el procedimiento tanto de extracción como de cuantificación de las vitaminas se hizo bajo luz dorada para evitar la degradación de las vitaminas.

Controles de calidad

Con el objeto de validar las mediciones realizadas, se corrieron junto con las muestras tres controles de calidad preparados a tres diferentes concentraciones de vitaminas, uno bajo, uno medio, y uno alto, tanto para retinol como para tocoferol. Estos se prepararon a partir de suero, ya sea agregando retinol y tocoferol o diluyendo con solución salina fisiológica de manera que se obtengan los tres niveles de concentración. A estas muestras control se les cuantificó su concentración exacta, analizándolos por lo menos durante 20 días consecutivos por duplicado para establecer la concentración media y sus niveles de confianza al 95% para cada suero control. Cada vez que se corrieron muestras problema, se analizaron también al principio y al final de la corrida un juego de controles de calidad para verificar la sensibilidad y la exactitud del análisis

Condiciones Cromatográficas:

Se usó un HPLC marca Waters, Modelo 600 con una bomba cuaternaria y desgasificador de solventes; con un detector programable UV/VIS Modelo 486 y un automuestreador Modelo 717 con compartimiento de muestras refrigerado. Para las corridas cromatográficas se siguieron las siguientes condiciones:

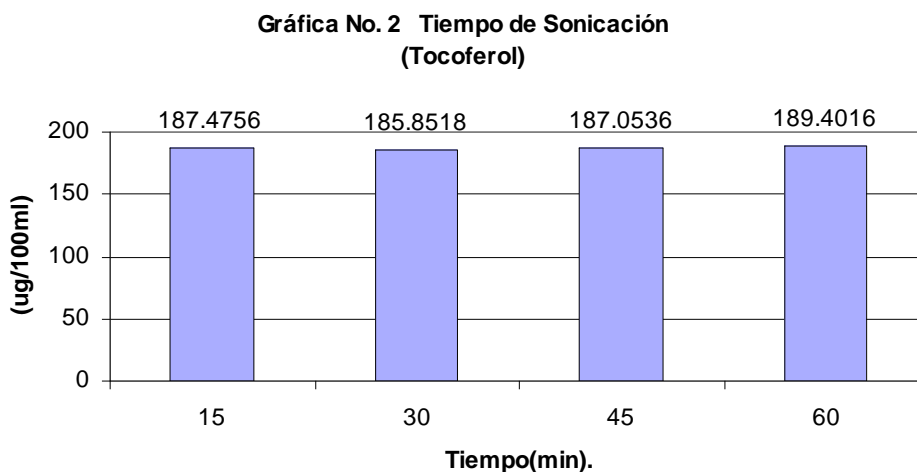
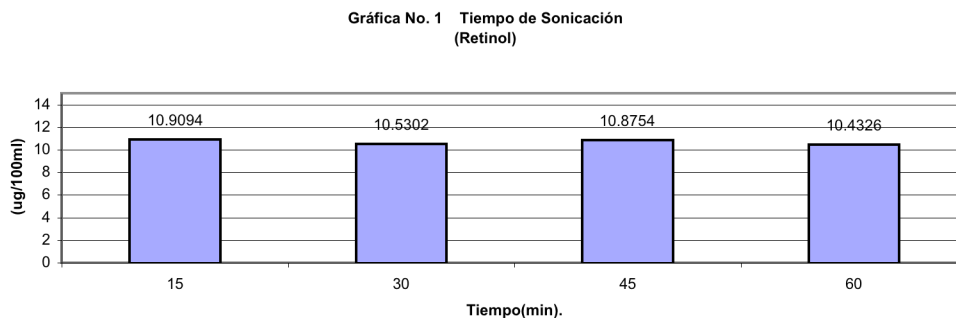
Columna	Nova-Pak C18, 4 μ m de 3.9 x 150 mm, con precolumna C18.
Fase Móvil	Metanol grado HPLC 100%.
Velocidad de Flujo	1.5 mL/min.
Detección	0 – 2.5 minutos a 325 nm
	2.5 – 4.5 minutos a 290 nm

Se prepararon Curvas Estándar de retinol y tocoferol en etanol. Las concentraciones Stock de las vitaminas se calcularon basadas en la Ley de Lambert y Beer usando el coeficiente de extinción de retinol de 1835 a 325 nm y el de tocoferol de 75.8 a 290 nm para corregir la pureza de las vitaminas. Las curvas estándar se utilizaron para calcular la concentración de cada vitamina en las muestras analizadas, tanto de suero como de GSS.

Para calcular los valores de retinol y tocoferol de GSS a equivalentes a retinol y tocoferol séricos se usó un factor “recuperación / volumen ajustado” (retinol o tocoferol sérico / retinol o tocoferol de GSS), que fue calculado del set de muestras analizadas. La mediana de estas relaciones se usó para ajustar la concentración de retinol y tocoferol de GSS a valores equivalentes de retinol y tocoferol séricos.

Resultados

De los resultados que se obtuvieron tenemos que de las pruebas de sonicación para sacar el tiempo de máxima extracción de los compuestos por analizar se tuvieron los siguientes resultados mostrados en las gráficas 1 y 2.



Como se puede ver no hubo diferencias en las concentraciones obtenidas para los 4 tiempos por lo que se decidió tomar un tiempo intermedio de 30 min para asegurar la extracción completa.

En las primeras pruebas que se hicieron para cuantificar las 2 vitaminas a partir del extracto de la sangre puesta en el sistema GSS, se vio que el tocoferol, dado su carácter de antioxidante, durante la toma de muestra y la extracción sufría una degradación por lo que no aparecía en los cromatogramas obtenidos. Para preservarlo de la oxidación se tuvo que hacer una modificación en la toma de sangre sobre los papeles filtro, impregnando estos papeles previamente con un antioxidante con el objeto de protegerlo, se probaron el ácido ascórbico y el ascorbato de sodio, a varias concentraciones, y se decidió usar el ascorbato de sodio al 0.5%, puesto que a esta concentración se obtuvieron buenos resultados de conservación.

Tabla 1. Retinol en suero venoso (SV), suero capilar (SC) y gotas de sangre seca capilar (GSSC) (μ g/100mL de suero).

Individuo	SV	SC	GSSC
1	52.391	39.360	39.585
2	75.113	90.904	79.431
3	49.570	53.311	43.786
4	35.443	33.842	38.598
5	44.625	44.441	46.987
6	43.189	41.892	44.147
7	43.747	45.957	56.343
8	56.067	55.348	49.394
9	31.923	33.905	35.307
10	40.978	39.751	34.886
11	47.905	46.567	40.228
12	60.262	59.983	56.468
13	40.165	39.959	32.728
14	34.918	44.168	43.211
15	45.617	42.038	39.345
16	39.650	43.979	59.770
17	70.959	77.659	87.749
18	67.597	60.998	69.363
19	41.533	42.326	44.711
20	36.657	46.899	41.207
21	34.465	40.685	38.212
22	34.357	34.509	37.329
23	34.272	39.671	44.272
24	36.886	40.967	39.772
25	35.726	29.981	30.843
26	58.105	51.118	41.378
27	33.795	41.187	40.952
promedio	45.404	46.719	46.519
desviación standar	\pm 12.14	\pm 13.25	\pm 13.73
		ANOVA	
		P < 0.013	

Tabla 2. Tocoferol en suero venoso (SV), suero capilar (SC) y gotas de sangre seca capilar(GSSC) (μ g/100ml de suero).

Individuo	SV	SC	GSSC
1	1270.476	884.983	927.501
2	3136.035	3591.952	3600.468
3	1211.071	1338.491	1182.791
4	813.876	712.498	1069.023
5	1436.265	1432.760	1662.412
6	1552.947	1428.554	1625.289
7	926.745	980.033	902.750
8	1351.126	1320.346	1078.891

9	1183.768	1066.147	1327.041
10	1385.686	1353.532	1320.169
11	1703.543	1744.482	1536.352
12	918.482	938.068	859.814
13	1026.340	947.937	797.143
14	719.679	860.861	909.451
15	896.935	779.801	809.435
16	873.436	798.628	734.156
17	952.427	986.762	884.167
18	1158.841	1058.237	691.331
19	966.416	750.952	873.788
20	669.790	847.260	845.252
21	804.343	813.332	947.240
22	362.448	293.320	356.549
23	799.368	805.728	846.575
24	533.684	486.516	651.229
25	864.156	696.440	775.299
26	1188.268	988.521	883.339
27	707.202	719.306	695.291
promedio	1089.38	1060.20	1066.39
	± 514.92	± 594.82	± 590.73
		ANOVA	
		P < 0.011	

Del análisis de las diferentes muestras de los 27 sujetos del estudio, SV, SC y GSSC, se obtuvieron los resultados que se presentan en las Tablas 1 y 2, en donde el valor de GSSC se obtuvo con el factor de “recuperación / volumen ajustado” para, con él, sacar los valores equivalentes a retinol sérico, que como podemos ver, en el promedio obtenido para cada muestra, tanto para retinol como para tocoferol, no hubo diferencias significativas de acuerdo al ANOVA realizado.

Como se describió en la metodología, cada día de análisis de muestras problema, se corrieron por duplicado los 3 controles de calidad para verificar tanto la sensibilidad como la validación de la cuantificación en todos los días de análisis, los controles de calidad estuvieron dentro de los límites de confianza obtenidos previamente, con lo que se aseguraron los resultados de las muestras problema.

Tabla 3. Coeficientes de Correlación de Pearson para Retinol y Tocoferol.

Sistema	Retinol	Tocoferol
SV/SC	0.95	0.97
SV/GSSC	0.85	0.94
SC/GSSC	0.88	0.96

Del análisis de correlación efectuado en las 3 diferentes muestras tanto de retinol como de tocoferol se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 3.

De acuerdo con el objetivo de este estudio que fue validar un método práctico y confiable como es el sistema GSS para cuantificar 2 vitaminas muy importantes para el buen funcionamiento del organismo y que fuera comprobable con las muestras de suero,

podemos ver en los resultados obtenidos que hubo una alta correspondencia entre estos dos métodos de toma de muestra para obtener los niveles de retinol y tocoferol, de los sujetos estudiados.

Los métodos tradicionales requieren de punción venosa, lo cual es un problema grande cuando se trata de neonatos, niños pequeños y grandes poblaciones de estudio, adicionalmente a esto, la cuantificación y el almacenamiento inmediato en congelación de las muestras, lo vuelve impráctico y costoso, sobre todo en países subdesarrollados.

En 1993 Olliver *et al*, (15) reportaron con éxito el uso de muestras de suero sobre papel filtro para el análisis de retinol por HPLC, sin embargo, este método tuvo limitaciones ya que se requería de una cantidad alta de muestra (200 µL), además de que este autor no probó la toma de muestra de sangre completa. Cuando Shi *et al*, (13) demostraron, en 1995, la posibilidad de medir retinol en GSS, se vio que este sistema abría la posibilidad de medir confiablemente esta vitamina. Posteriormente, en 1999, Craft *et al*, (9), comprobaron que en este sistema GSS se podía analizar retinol y que éste era comparable con el retinol sérico obtenido por punción venosa con una correlación de 0.90.

Sin embargo en todos estos estudios previos en GSS sólo se analizó retinol con diferentes opciones de cuantificación; en este trabajo se presenta la posibilidad de analizar conjuntamente retinol y tocoferol del sistema GSS, cuantificándolos por HPLC simultáneamente con una alta correlación con el suero obtenido por punción venosa, que es el patrón de referencia para estas mediciones.

CONCLUSIONES

Se pudo comprobar que el contenido de retinol y tocoferol en muestras de suero venoso, suero capilar y gotas de sangre saca capilar son iguales entre sí, lo que quiere decir que no hay ninguna diferencia significativa en cuanto a la cantidad de las vitaminas si se miden de cualquiera de las tres diferentes muestras.

Se concluye que el método propuesto para la cuantificación de estas vitaminas es una buena alternativa para eliminar los problemas presentados por los métodos tradicionales por punción venosa, con lo que se optimiza en gran medida la toma de muestra ya que no se requiere de personal entrenado ni de aparatos especiales para la toma de muestra y el almacenamiento que requiere de congelación inmediata, lo que disminuye importantemente su costo, sobre todo, cuando se trata de estudios poblacionales.

Los resultados obtenidos muestran que el sistema gota de sangre seca de sangre capilar (GSSC) es una buena alternativa para cuantificar retinol y tocoferol, ya que es comparable con las concentraciones séricas (SV).

REFERENCIAS

- 1.- L. Kathleen Maban, Sylvia Escote-Stump, *Nutrición y Dietoterapia de Krause*, Mc Graw Hill, 9ª edición, pp. 77-123, México, 1998.
- 2.- Mora, J. O., Herrera, MG Suecsun, J., Navarro, L., Wanger, M. "The effects of nutritional supplementation on physical growth of children at risk of malnutrition", *Am J Clin Nutr.*, vol. 34, pp. 1885-1892, 1981.
- 3.- Pelletier, D. L., Frongillo, E, Habitch, J-P, "Epidemiologic evidence for a potentiating effect of on child mortality". *Am J Public Health*, vol. 83, pp. 1130.1133, 1993.

- 4.- West K, P., Le clero., Shrestha, S. R., Wu, L. S-F, Pradhan, E. K., Khatry, S. K., Katz, J., Adhikari, R., Sommer, A. "Effects of vitamin A on growth of A-deficient children: Field Studies in Nepal". *J Nutr*, vol. 127, pp. 1957-1965, 1997.
- 5.- Bauernfeind Christopher J, *Vitamin A Deficiency and Its Control, Academic Press Inc*, pp. 19-95, 1986.
- 6.- Susanne K. Gaby, Adrienne Bendich, Vishwa N. Sing, Lawrence J. Machlin, "Vitamin Intake and Health", *A Scientific Review*, Marcel Dekker, Inc., pp. 71-103, 1991.
- 7.- Encuesta Nacional de Nutrición 1999, *Estado nutricional de niños y mujeres en México*. Secretaria de Salud, Instituto Nacional de Salud Publica, Geografía e Informática.
- 8.- Underwood, B & Arthur, P., "The Contribution of Vitamin A to Public Health", *FASE B J Nutr*, vol. 130, pp. 882-885, 2000.
- 9.- Craft N.E., Haiteme, T., Brindle, L. K., Yamini, S. Humphrey, J.H., West, K.P., Jr., "Retinol Analysis in Dried Blood Sports by HPLC". *J Nutr.*, pp. 882-885, 2000.
- 10.-Craft, N.E., Bulux, J., Valdez, C., Li, Y., Solomons, N.W. "Retinol Concentrations in Capillary Dried Blood Sports From Healthy Volunteers: Method Validation", *Am J Clin Nutr*, vol. 72, pp. 450-454, 2000.
- 11.-O'Broin, S. D., Gunter, E. W., "Screening of Folate Status with use of Dried Blood Spot son Filter Paper", *Am J Clin Nutr*, vol. 70, pp. 359-356, 1999.
- 12.-Maldonado, J "Comparación del contenido de Flotato en Sangre Obtenidas Mediante dos diferentes Métodos de Muestreo", *Tesis, Licenciatura en Química*, Universidad La Salle, 2000.
- 13.-Shi, Ma, Y., Humphrey, J.H., Craft, N.E. "Determination of Vitamin A in Dried Human Blood Spots By High-Performance Capillary Electrophoresis with laser-excited Fluorescence Detection", *J Chromatogr B Biomed Appl.*, vol. 665, pp. 89-96, 1995.
- 14.- Ma. Y. Wu, Z. Furr, H.C., Lammi- Kreefe, C., Craft, N.E., "Fast Minimicroassay of Serum Retinal (vitamin A) by Capillary Zone Electrophoresis With Laser-Excited Fluorescence Detection", *J Cromatogr.*, vol. 616, pp. 31-37, 1993.

Diferencias en la resistencia a los antimicrobianos de cepas de staphylococcus aureus obtenidas de diversas fuentes de aislamiento.

María Guadalupe Morales, Meza
Investigadora. Escuela de Ciencias Químicas
UNIVERSIDAD LA SALLE
E-mail: gmorales@ci.ulsal.mx

Claudia Gabriela Ruiz de Chávez Ramos
Escuela de Ciencias Químicas,
Universidad La Salle

[Recibido: Octubre de 2005. Aceptado: Diciembre de 2005](#)

RESUMEN

En este estudio se determinó la resistencia antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* obtenidas de diversas fuentes de aislamiento para comparar los patrones de resistencia alcanzados de acuerdo con su origen y así establecer si la resistencia a los antibióticos está asociada al origen de aislamiento. Para esto se aislaron 187 cepas a partir de 483 muestras que incluyeron alimentos, ambiente, portadores sanos y portadores enfermos; se realizó la identificación de las cepas por métodos bioquímicos y aquellas confirmadas como *S.aureus* se conservaron a -20°C . Con las cepas obtenidas se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por el método de Bauer-Kirby a los antibióticos comúnmente utilizados para Gram (+). Después de interpretar la prueba se realizó un análisis estadístico de los resultados mediante la prueba χ^2 de Pearson.

La frecuencia de aislamiento fue de 38.7% de *S.aureus* de todas las muestras manejadas, lo que confirma el hecho de que esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida. De los antibióticos probados, en la dicloxacilina, tetraciclina y eritromicina, según el análisis estadístico, se encontró que la resistencia es dependiente del origen de aislamiento. En el caso de la dicloxacilina, este es un antibiótico muy usado en animales, lo que selecciona cepas resistentes que se mantienen en productos de origen animal como los cárnicos y lácteos. El origen de las cepas resistentes a la tetraciclina y eritromicina se considera humano, ya que éstas se encontraron en los alimentos que tienen mucha manipulación durante su proceso y comercialización (jamón, tocino). Para otros antibióticos como lo fueron la penicilina, pefloxacina, cefuroxima, gentamicina, cefotaxima, ampicilina, ceftazidima y cefalotina se encontró que la resistencia es independiente del origen, lo que implica que los genes de resistencia en las cepas de *S. aureus* para estos antibióticos están ampliamente distribuidos sin importar el hábitat.

Palabras clave: Staphylococcus aureus, resistencia, antibióticos, multirresistencia

ABSTRACT

This study investigated the possible association between the staphylococcus aureus resistance to common antibiotics and its isolation origin, in order to establish if there is a link between them. 187 strains were isolated from 483 samples from different sources such as food, environment, and healthy and unhealthy carriers. These strains were tested using biochemical tests. The strains identified as *S aureus* were maintained at – 20°C and carried to antimicrobial susceptibility tests to the commonly antibiotics for grampositive bacteria by using the Bauer- Kirby method. Having obtained the results, they were statistically analyzed by the χ^2 Pearson trial.

From the total amount of all the tested samples, the *Staphylococcus aureus* isolation frequency was 38.7% supporting its widely occurrence. According to the statistics analyses from all the tested antibiotics, it was just for the dichloxacillin, tetracycline and erythromycin where the resistance depended on the isolation origin. Dichloxacillin is commonly used in animals; this is why these resistant strains are found in animal products such as meat and dairy ones. The tetracycline and erythromycin origin isolation is considered to be human because the resistant strains were found in handled food (bacon, ham) during its distribution and process. There was found no dependence between resistance and isolation origin for the following antibiotics penicillin, pefloxacin, cefuroxime, gentamicin, cefotaxime, ampicillin, ceftazidime, and cefalotina which means that for these antibiotics it doesn't matter the habitat, the resistant genes of *Staphylococcus aureus* are very widespread.

Key words: *Staphylococcus aureus*, resistance, antibiotics, multi-resistance

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es la especie más común del género *Staphylococcus*. Las bacterias de esta especie son patógenas del hombre y otros mamíferos (14,26). Prácticamente todos los mamíferos son portadores de *S.aureus*, sin embargo, esta bacteria es responsable de infecciones e intoxicaciones tanto en el hombre como en los animales. En el hombre, dichas infecciones son de difícil manejo con los antibióticos disponibles, la razón es que algunas cepas de *S.aureus* son resistentes a la mayoría de los antibióticos comúnmente usados, lo cual deja pocas opciones de tratamiento para personas infectadas con una cepa resistente (6,14,18).

S.aureus es también la principal causa de la intoxicación alimentaria estafilocócica. Ésta resulta de la ingesta de una o más toxinas estafilocócicas preformadas en alimentos contaminados.(18) La causa de que *S.aureus* sea capaz de provocar tantas y tan severas infecciones reside en su amplia y variada producción de productos extracelulares, los cuales funcionan como factores de virulencia de la bacteria.(18) Aunque es capaz de crecer en condiciones anaerobias, el mejor crecimiento ocurre bajo condiciones aerobias. Su temperatura óptima de crecimiento es de 35°C y su pH de 7.0-7.5. Presenta mejor crecimiento en un medio libre de NaCl; sin embargo, tolera concentraciones de 10-20%. Requiere de una mínima concentración de sacarosa en el medio para crecer, pero puede soportar concentraciones hasta del 60%. La mínima actividad de agua (a_w) que requiere es de 0.86 en condiciones aerobias y 0.90 en anaerobias (6,26,42).

S.aureus se encuentra normalmente en el aire, polvo, drenaje, agua, leche, alimentos y superficies ambientales, sin embargo, sus principales portadores son los humanos y mamíferos terrestres y marinos, los cuales lo alojan en la piel y membranas mucosas. Aunque es un organismo patógeno, el 50% de los humanos son portadores sanos de

esta bacteria (4,22,26,42,56). Los factores de virulencia de *S.aureus* consisten en la producción de una gran variedad de exoproteínas y enzimas, además de las características antigénicas que le proporciona su pared celular (12,18). Antes de la introducción de los antibióticos a la medicina, las expectativas de una persona ante una infección estafilocócica no eran buenas, pero después de la introducción de la penicilina, en 1941, esto cambió dramáticamente. Sin embargo, pocos años después, comenzaron a aparecer cepas resistentes a la penicilina y para 1946 más del 50% de las cepas nosocomiales resultaban resistentes a este antibiótico. *S.aureus* se comportó de igual manera ante la introducción de nuevos antibióticos, como la estreptomina, tetraciclina, cloranfenicol y los macrólidos (24,33). En 1959 se introdujo un antibiótico resistente a la β -lactamasa (enzima producida por las cepas resistentes que desactiva el anillo β -lactámico de las penicilinas). Durante algunos años, este antibiótico parecía haber resuelto el problema, sin embargo, para finales de la década de los años 60 se comenzaron a aislar cepas resistentes a este nuevo antibiótico, y durante la década de los años 70, el porcentaje comenzó a ser de seria importancia. Para este entonces, ya se reconocía que *S.aureus* también había desarrollado resistencia a la gentamicina, neomicina y a las sulfonamidas, asimismo se encontró que una cepa resistente a la metililina también lo era a todos los antibióticos β -lactámicos y, en numerosos casos, a muchos de los otros antibióticos (24,33,40).

Hoy en día, un 95% de las cepas aisladas de *S.aureus* son resistentes a la penicilina, y cerca del 40% de las cepas nosocomiales son resistentes a la metililina (26). Actualmente, las infecciones ocasionadas por una cepa resistente a la metililina o MRSA son tratadas con vancomicina, sin embargo, en 1996 se reportó en Tailandia una cepa poco sensible a este antibiótico, con subsecuentes reportes similares alrededor del mundo (8,47,55). En 2002 se hizo el primer reporte de una cepa totalmente resistente a la vancomicina en los Estados Unidos, aunque esta cepa resultó ser sensible a otros antibióticos como al cotrimoxazol, cloranfenicol y tetraciclinas. La idea de que dicha resistencia sea transferida a una cepa multirresistente, en especial a una resistente a la metililina, nos transportaría 60 años atrás cuando la gente moría por infecciones estafilocócicas (32,49).

JUSTIFICACIÓN

Desde la introducción de los antibióticos a la medicina, el *Staphylococcus aureus* ha sido objeto de estudio a causa de la facilidad que presenta para desarrollar mecanismos de resistencia hacia éstos. Se han encontrado cepas resistentes a prácticamente todos los antibióticos disponibles para su tratamiento, incluyendo recientemente a la vancomicina, antibiótico que permanecía como única opción ante una cepa multirresistente.

Por esta razón se han realizado un sinnúmero de estudios a esta bacteria, no obstante, la mayoría se centran principalmente en el estudio de las cepas de origen nosocomial y existe muy poca información sobre la resistencia en cepas comunitarias.

Por ello se consideró de importancia el estudio de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de diferentes fuentes de aislamiento, así como la comparación entre los patrones de resistencia obtenidos.

Objetivo General

Determinar la resistencia antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* obtenidas de diversas fuentes como lo son alimentos, ambiente y humanos.

Objetivos Particulares

- (1) Aislar *Staphylococcus aureus* de diferentes tipos de muestras.
- (2) Identificar, mediante métodos microbiológicos, las cepas aisladas.
- (3) Realizar pruebas de resistencia a diferentes antimicrobianos a las cepas aisladas.
- (4) Comparar los patrones de resistencia obtenidos de acuerdo a su origen de aislamiento.
- (5) Determinar si la resistencia a los antibióticos esta asociada con su origen.

HIPÓTESIS

Hipótesis Nula

La resistencia de *Staphylococcus aureus* hacia los antibióticos probados es independiente de su origen.

Hipótesis Alternativa

La resistencia de *Staphylococcus aureus* hacia los antibióticos probados es dependiente de su origen.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento

Para el desarrollo de ésta investigación se trabajaron 483 muestras de diferentes orígenes (alimentos, ambiente, portadores sanos, portadores enfermos, superficies y trabajadores de hospital), de las cuales se aislaron 187 cepas en total. El procedimiento se llevó a cabo entre noviembre de 2002 y junio de 2003. Se utilizó un abatelenguas estéril para manipular el alimento y una charola de aluminio también estéril, se pesaron 10 g del alimento y se suspendió en caldo peptonado al 0.1%, se agitó y dejó reposar por unos minutos, posteriormente se sembró 0.1 mL de este caldo extendiéndolo en una placa de agar Vogel-Johnson y se incubó a 37°C por 48 horas (2,4). Para obtener las muestras del ambiente se colocaron placas abiertas con agar Vogel-Johnson, durante 3 horas, en lugares en que hubiera movimiento de gente; pasado el tiempo la caja se cerró e incubó a 37°C por 48 horas (2,4). Para obtener las muestras de portadores, tanto sanos como enfermos, se tomó una muestra de la garganta de la persona con un hisopo estéril, se sembró directamente en una placa de agar Vogel-Johnson y se incubó a 37°C por 48 horas.

Las muestras de las mascotas se tomaron del mismo modo (2,4). Para obtener muestras del suelo se recolectó tierra obtenida de diversos lugares que se encontraran al aire libre, como macetas, jardines y camellones. Utilizando un abatelenguas estéril para manipular la muestra y una charola de aluminio también estéril, se pesaron 10 g de tierra y se suspendió en caldo peptonado al 0.1%, se agitó y dejó reposar por unos minutos, posteriormente se sembró 0.1 mL de este caldo peptonado extendiéndolo en una placa de agar Vogel-Johnson y se incubó a 37°C por 48 horas (2,4).

Las muestras de hospital fueron tomadas en el Hospital General Regional Lic. Ignacio García Téllez del Instituto Mexicano del Seguro Social de Cuernavaca, Morelos. Aquí se tomaron muestras de diferentes orígenes como manos y garganta de médicos y enfermeras, ambiente y superficies (como mesas de instrumental y mesas de cirugía). En el caso de las muestras de ambiente y de garganta se tomaron como se describió previamente. Para las muestras de manos y superficie se humedeció con agua estéril un hisopo estéril y se pasó por las palmas, el dorso de la mano y entre los dedos o por las orillas de las mesas o por lugares que presentaran poco aseo posteriormente se sembró con el hisopo en una placa de agar Vogel-Johnson y se incubó a 37°C por 48 horas (2,4).

Identificación

Morfología Colonial: En las placas de agar Vogel-Johnson se buscaron colonias negras, opacas, circulares y con bordes enteros, de 1 a 3 mm de diámetro (4).

Fermentación del Manitol: Ya que el medio de cultivo utilizado contiene manitol y rojo fenol como indicador, en la caja se puede observar un halo amarillo alrededor de las cepas manitol positivo y un halo rosa en las que son manitol negativo, *S.aureus* sí fermenta al manitol, por lo que además de las características coloniales antes mencionadas, la colonia también debía tener un halo amarillo. Cuando se encontraron colonias con las características de *S.aureus* pero no se observaba un halo amarillo o rosa, se realizaba una prueba adicional de fermentación de manitol en tubo para confirmar (2).

Morfología Microscópica: Se hizo un frotis de una o dos colonias, por cada caja de Vogel-Johnson, con las características antes mencionadas y se tiñó por el método de Gram (45). Se observaron los frotis buscando cocos Gram-positivos y dispuestos en forma de racimos. Las colonias que se identificaron presuntamente como *S.aureus* se sembraron en BHI y se incubaron a 37°C por 24 horas para posteriores pruebas y conservación (26).

Prueba de catalasa: *S.aureus* produce catalasa. Para realizar esta prueba se tomó una asada de la cepa previamente sembrada en BHI y se colocó directamente sobre un portaobjetos, a continuación se dejó caer una gota de peróxido de hidrógeno al 30% sobre la muestra de la cepa. Si se observaba la producción de efervescencia la prueba resultaba positiva (2,25).

Prueba de coagulasa: La prueba de producción de coagulasa se realizó inoculando plasma de conejo con una asada de la cepa y se incubó durante 4 horas a 37°C. La formación de un coágulo se tomaba como positiva, las pruebas que resultaban negativas, después de las 4 horas, se dejaron incubar hasta que se cumplieran 24 horas, las pruebas que después de este tiempo aún resultaron negativas, se consideraban como tal (2,25). Las cepas identificadas como *S. aureus* se conservaron en congelación para su posterior análisis de resistencia.

Pruebas de Susceptibilidad a los antibióticos

Se determinó la susceptibilidad a los antibióticos utilizando multidiscos Gram-positivos Bio-Rad mediante el método de difusión en discos de Bauer-Kirby (9,11). Se inoculó en un tubo con 5 mL de caldo TSB (Soya-Tripticasa), se incubó a 37°C durante un periodo de 2 a 5 horas para tener aproximadamente 10^8 m.o./mL, en el tubo previamente inoculado se ajustó la turbidez del tubo comparando de acuerdo al estándar 0.5 de McFarland (0.5% de $BaCl_2$ 0.048 M + 99.5% de H_2SO_4 al 1% V/V). Si el tubo aún no había alcanzado dicha turbidez se dejaba incubar durante más tiempo. Se humedeció un hisopo estéril con el cultivo estandarizado y se sembró de manera masiva en una caja de agar Müller-Hinton. Después de inocular el agar se dejó secar cinco minutos y se colocó un multidisco Gram-positivo Bio-Rad sobre el agar, se esperaron 15 minutos, después de lo cual se invirtió la caja y se colocó en la incubadora. Se incubó a 37°C por un periodo de 16 a 18 horas. Se midieron los halos de inhibición y se determinó la susceptibilidad siguiendo los diámetros para resistencia, intermedio y sensible que marca el fabricante.

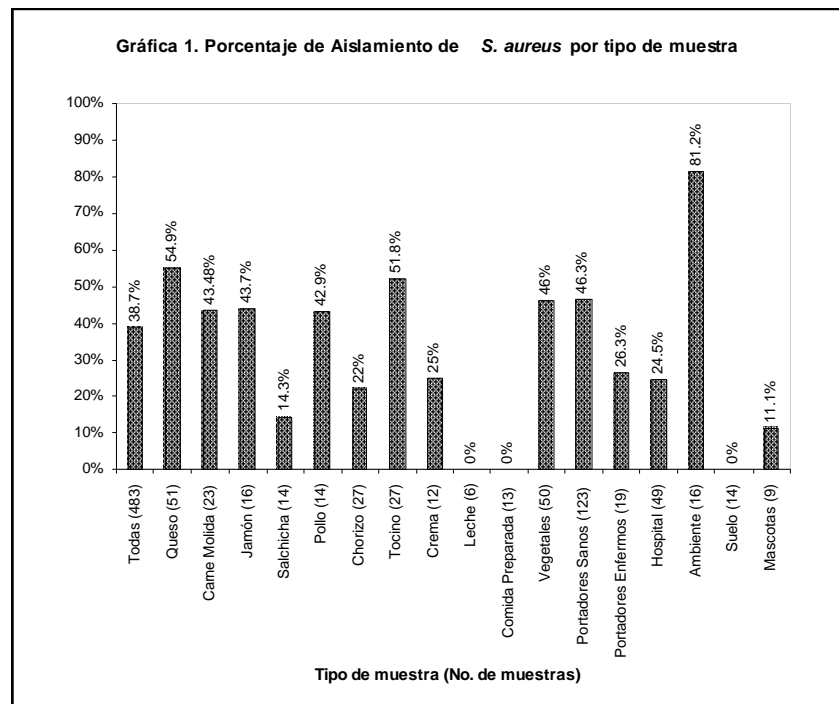
Análisis Estadístico

La comparación entre los porcentajes de resistencia se realizó mediante la prueba de χ^2 de Pearson a un nivel de significancia de 0.05. Se utilizó el programa Stata 3.0 para efectuar este análisis (20).

RESULTADOS

Aislamiento

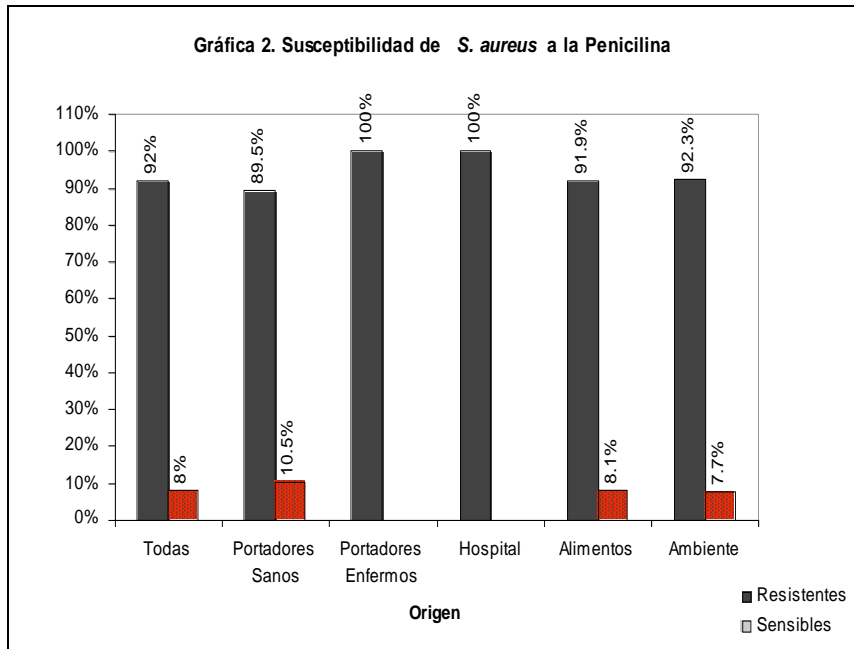
Se analizaron 483 muestras, de las que se aislaron 187 cepas de *Staphylococcus aureus*, lo que representa el 38.7%. En la gráfica 1 se muestra el porcentaje de aislamiento de *S.aureus* así como el número de muestras tomadas por cada origen.



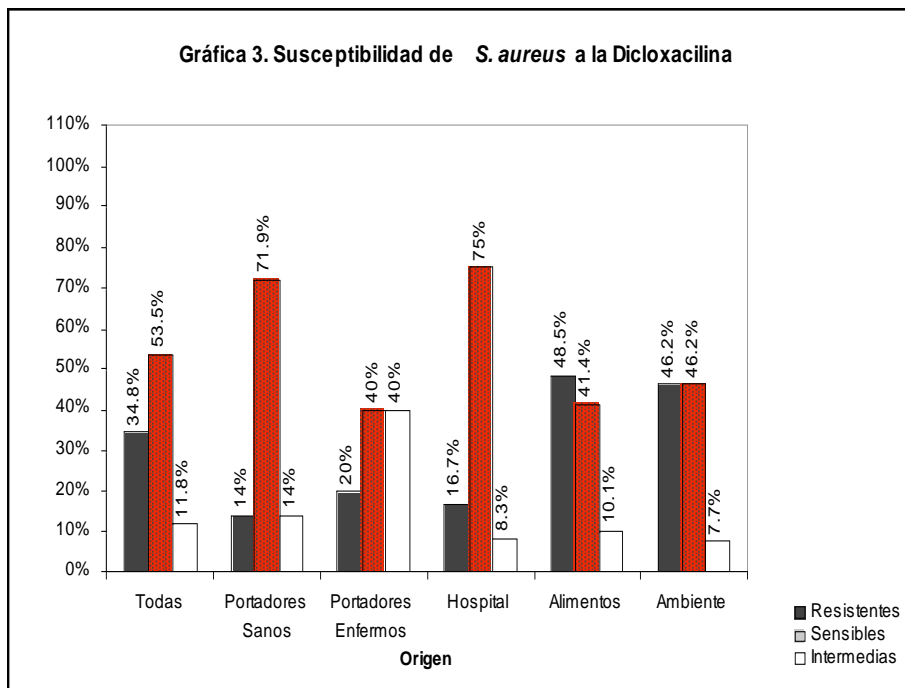
Gráfica 1. En esta gráfica se observa el número de muestras trabajadas por origen y el porcentaje de aislamiento en cada uno.

Susceptibilidad de las cepas de *S. aureus* a los antibióticos

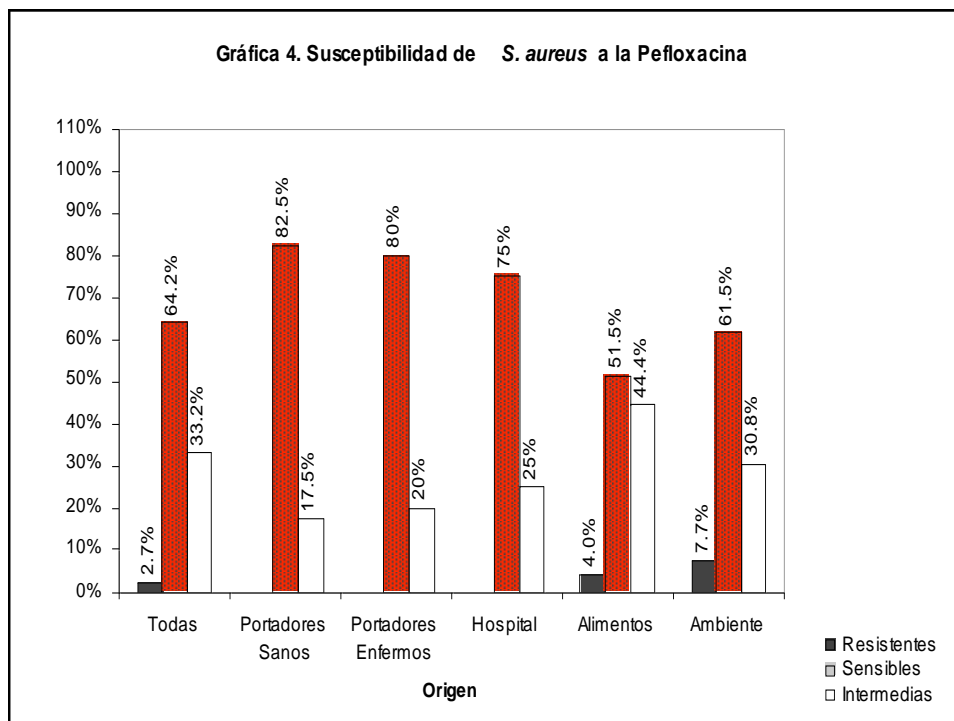
En las gráficas 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 y 12 se muestran los porcentajes de cepas resistentes, sensibles y de sensibilidad intermedia para cada uno de los antibióticos probados de acuerdo al origen de las cepas. El valor de p obtenido de acuerdo a la prueba χ^2 de Pearson para cada antibiótico fue: penicilina $p=0.743$, dicloxacilina $p<0.05$, pefloxacina $p=0.409$, cefuroxima $p=0.853$, gentamicina $p=0.183$, cefotaxima $p=0.89$, tetraciclina $p=0.432$, ampicilina $p=0.256$, eritromicina $p<0.05$ ceftazidina $p=0.606$ y cefalotina $p=0.927$. El método de susceptibilidad antimicrobiana de Bauer-Kirby determina si una cepa es resistente, sensible o de sensibilidad intermedia; las gráficas de resultados se muestran tomando en cuenta estos tres criterios; sin embargo, para la realización de la prueba estadística los resultados se resumieron en dos criterios, resistentes y no resistentes, siendo no resistentes todas las cepas que resultaron sensibles o de sensibilidad intermedia. En este grupo de gráficas no se incluye la trimetoprima-sulfametoxazol, ya que no se encontraron cepas resistentes.



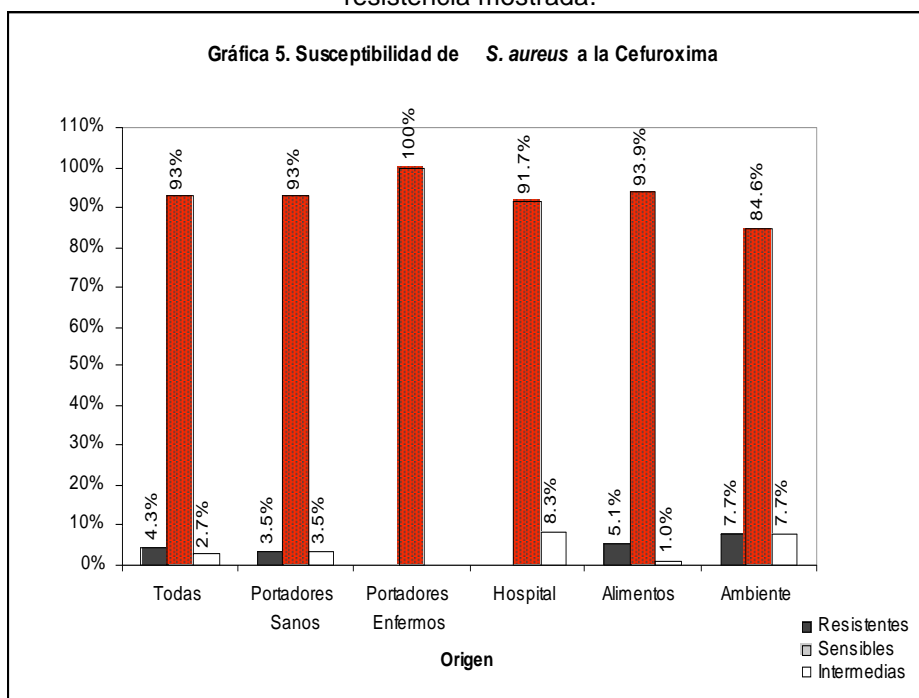
Gráfica 2. En esta gráfica se observa que la resistencia a la penicilina por *S. aureus* es muy alta, para este antibiótico la $p=0.743$, por lo que la resistencia es independiente del origen.



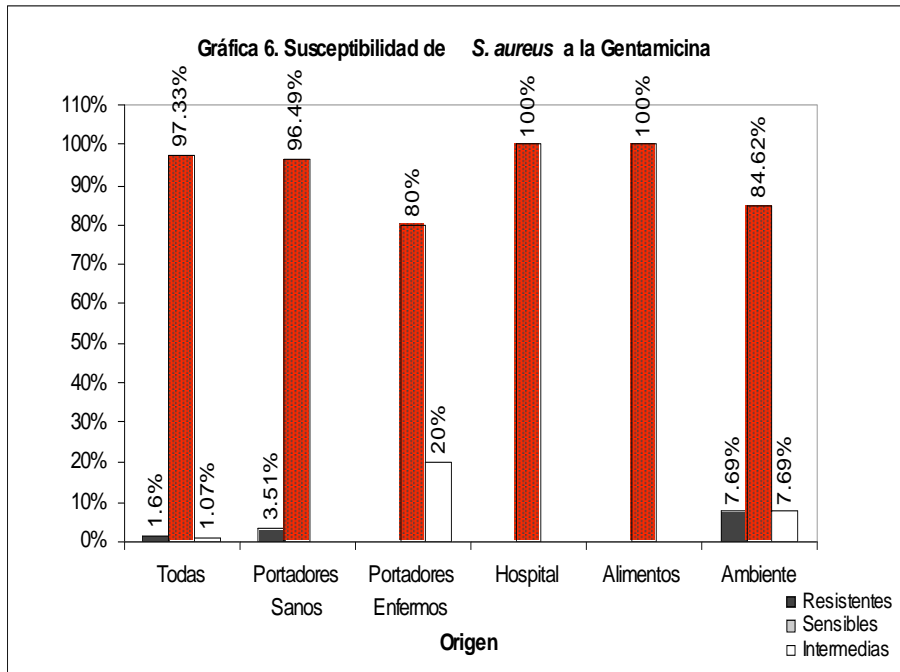
Gráfica 3. En esta gráfica se observa mayor resistencia a la dicloxacilina por *S. aureus* aislado de alimentos y ambiente la $p= <0.05$ nos indica que la resistencia es dependiente del origen de aislamiento



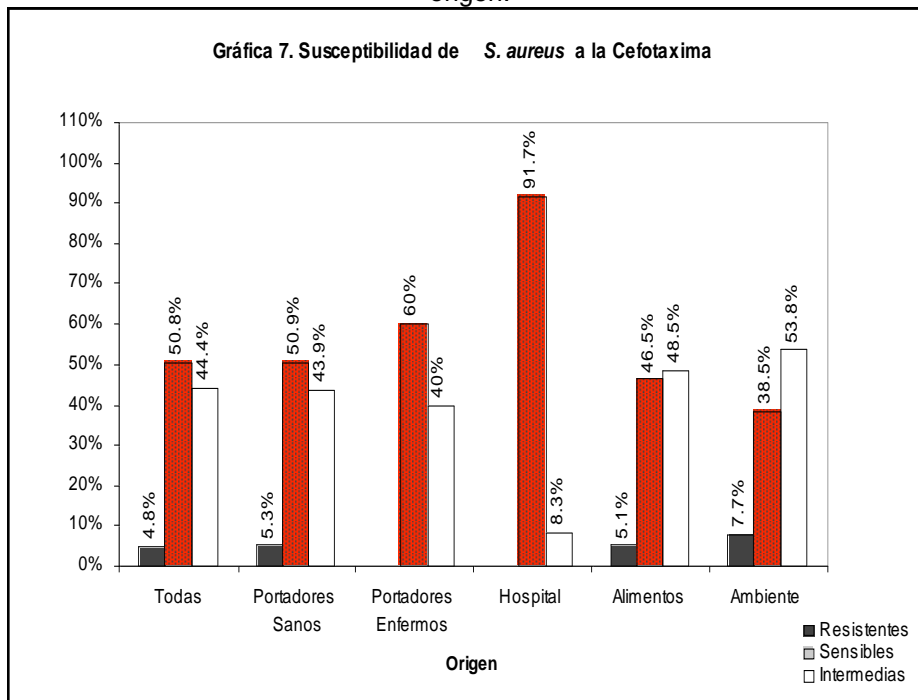
Gráfica 4. En esta gráfica se observa que la mayoría de las cepas de *S. aureus* fueron sensibles a la pefloxacina se obtuvo una $p=0.409$ siendo independiente del origen la resistencia mostrada.



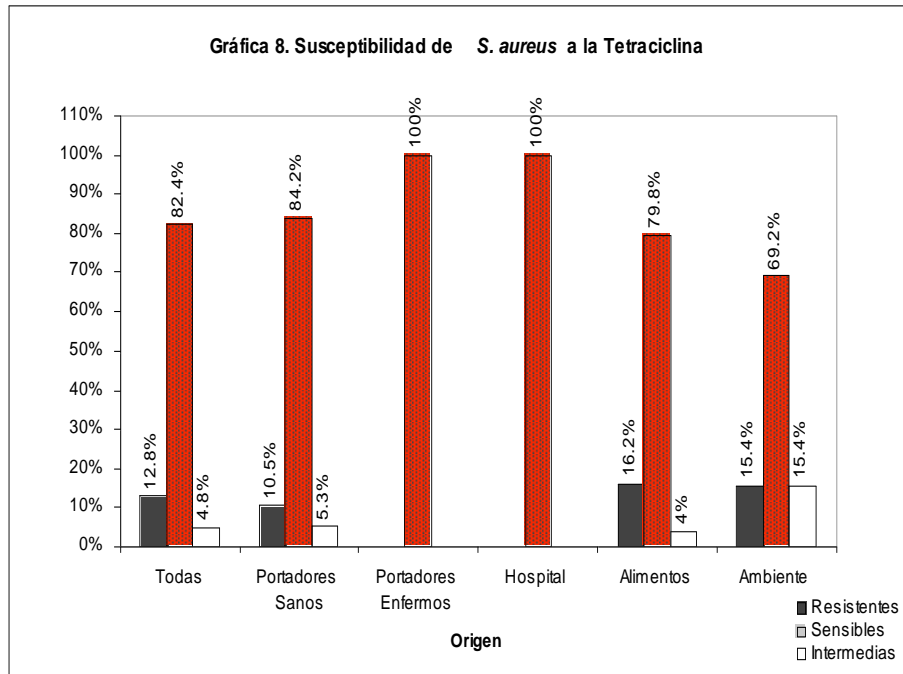
Gráfica 5. En esta gráfica se observa que la mayoría de las cepas de *S. aureus* son sensibles a la Cefuroxima, encontrando una $p=0.853$ por lo que la resistencia encontrada es independiente del origen.



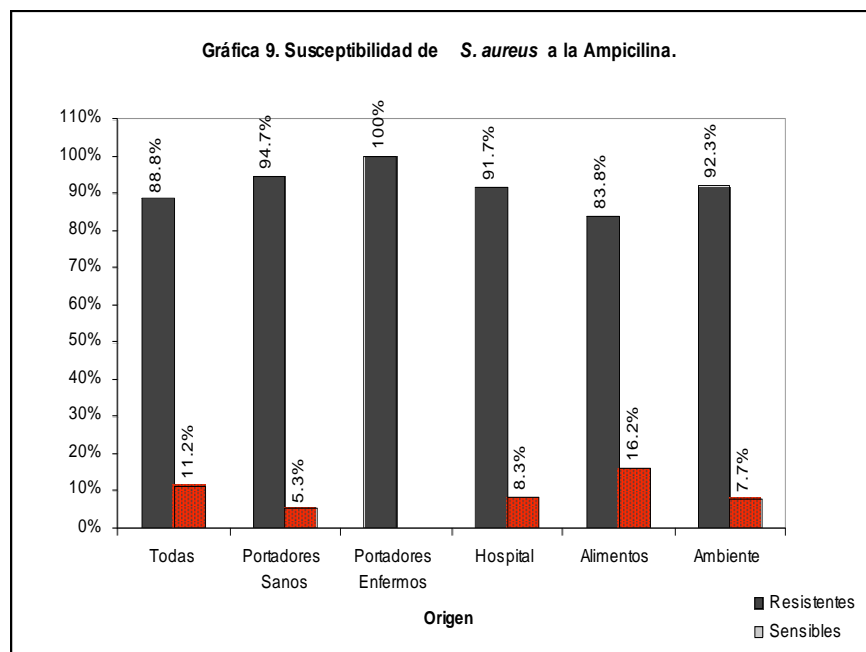
Gráfica 6. En esta gráfica se observa que la mayoría de las cepas son sensibles a la gentamicina la $p=0.183$ nos indica que la resistencia encontrada es independiente del origen.



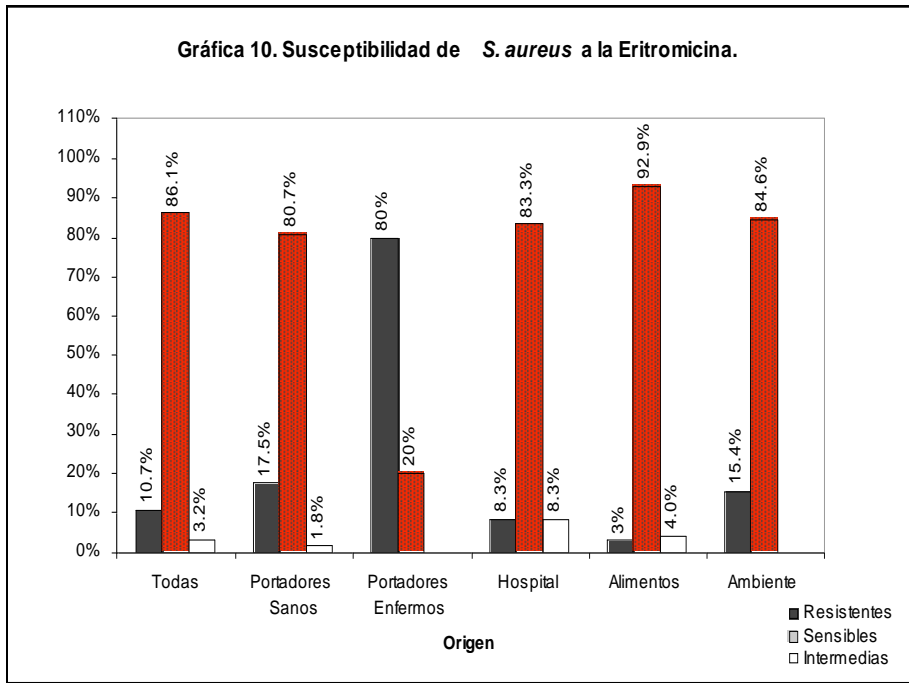
Gráfica 7. En esta gráfica se observa que la mayoría de las cepas de *S. aureus* fueron sensibles a la Cefotaxima encontrando una $p=0.89$ por lo que la resistencia encontrada es independiente del origen.



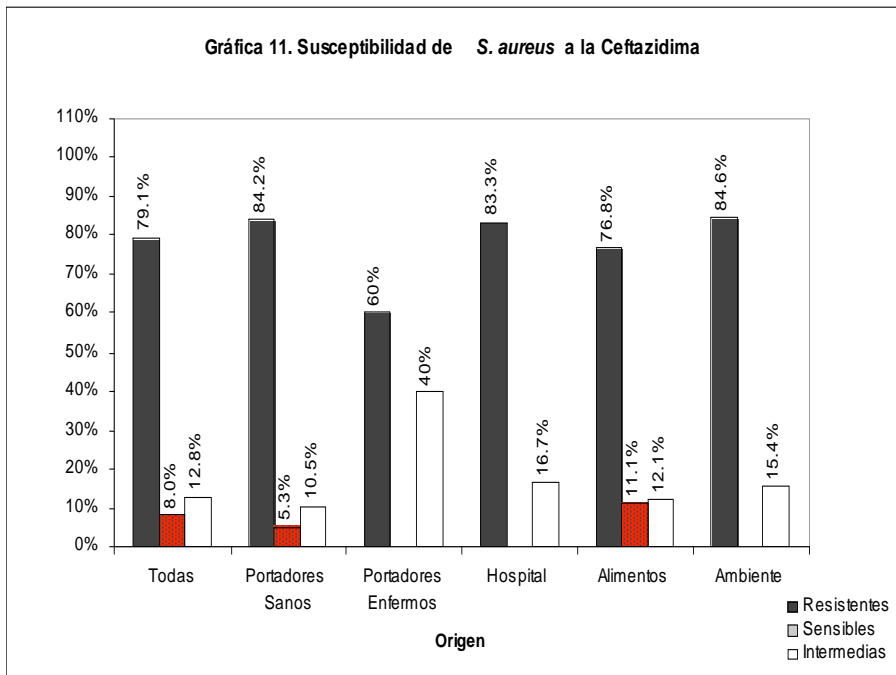
Gráfica 8. En esta gráfica se observa que la mayoría de las cepas de *S. aureus* fueron sensibles a la tetraciclina obteniendo una $p=0.432$ por lo que la resistencia encontrada es independiente del origen.



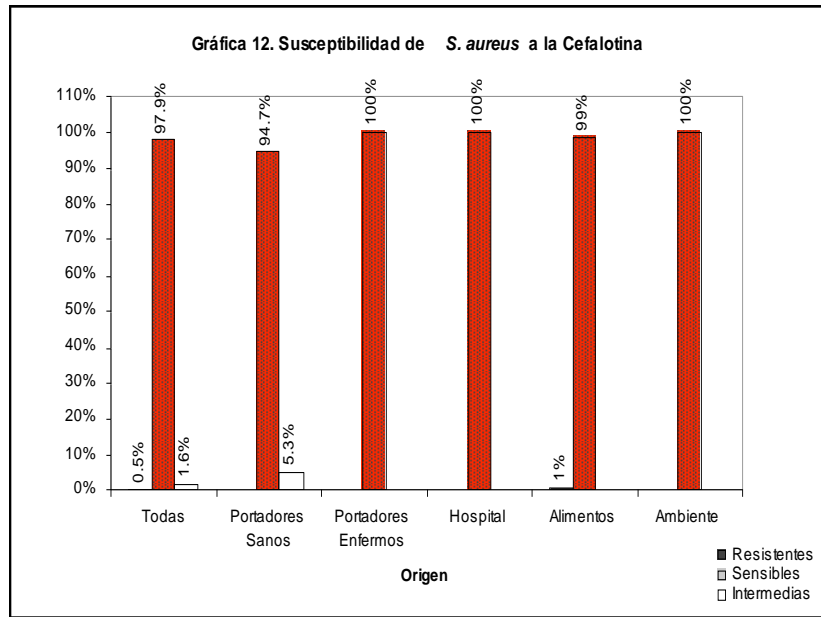
Gráfica 9. En esta gráfica se observa que la resistencia a la ampicilina es muy alta, la $p=0.256$ nos indica que esta resistencia es independiente del origen de aislamiento.



Gráfica 10. En esta gráfica se observa que en el grupo de cepas aisladas de portadores sanos fue donde se encontró la mayor resistencia, la $p=0.<0.05$ nos indica que esta resistencia es dependiente del origen.

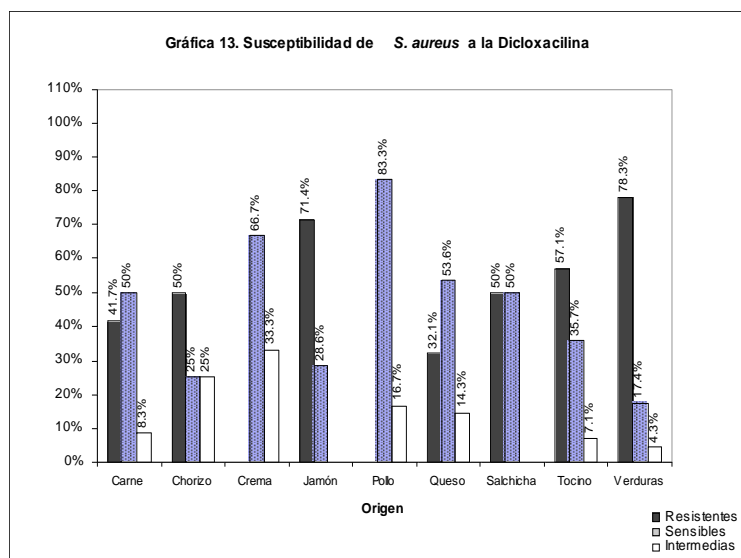


Gráfica 11. En esta gráfica se muestra que las cepas de *S. aureus* muestran una gran resistencia la $p=0.606$ nos indica que esta resistencia es independiente del origen de aislamiento.

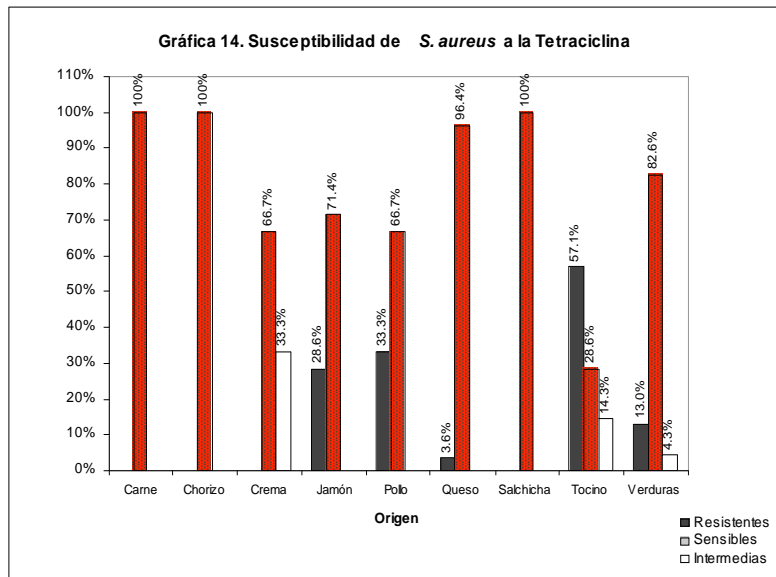


Gráfica 12. En esta gráfica se observa que todas las cepas de *S. aureus* fueron sensibles a la cefalotina, la $p=0.927$.

Para las muestras de alimentos se realizó una comparación estadística independiente ya que el grupo de alimentos incluyó muchos tipos. Después del análisis por tipo de alimento a los diferentes antibióticos se encontró que para la dicloxacilina y la tetraciclina presentaron una $p<0.05$ por lo que las diferencias resultaron significativas. En las gráficas 13 y 14 se muestran estos resultados encontrando que el mayor porcentaje de cepas resistentes a la dicloxacilina se aislaron de verduras y jamones mientras que la resistente a la tetraciclina se encontró en el tocino.



Gráfica 13. En esta gráfica se muestra la resistencia que presentó *S. aureus* dependiendo del tipo de alimento, se calculó una $p<0.05$ por lo que la resistencia es dependiente del origen.



Gráfica 14. En esta gráfica se muestra la resistencia de las cepas de *S. aureus* aisladas por tipo de alimento encontrando una $p < 0.05$ por lo que la resistencia es dependiente del origen.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Staphylococcus aureus es un microorganismo ampliamente distribuido, ya que se aisló en un 38.7% de todas las muestras manejadas de diferente origen: En el hombre, la frecuencia de aislamiento de *S. aureus* se reporta como del 50% (26), lo cual se pudo comprobar en este estudio, en donde se observó una frecuencia de aislamiento del 46.3% en muestras de portadores sanos. En el caso de los portadores enfermos se obtuvo una frecuencia de aislamiento de 26.3%; esto pudo deberse a que para el aislamiento de *S. aureus* en portadores enfermos se seleccionaron personas que tuvieran problemas de la garganta o vías respiratorias, sin embargo, esto no quiere decir que la enfermedad fuera a causa de una infección por este microorganismo.

La frecuencia de aislamiento de cepas de *S. aureus* en muestras obtenidas de un hospital de la ciudad de Cuernavaca fue del 24.4% (14/49). Esto nos habla de una bacteria presente en las instalaciones y en el personal, lo que favorece la aparición de cepas intra-hospitalarias resistentes. En el ambiente, la frecuencia de aislamiento fue elevada (81.2%), estas muestras fueron tomadas en lugares con mucha afluencia de gente, por lo que se presume que la mayoría de las cepas obtenidas provienen de portadores humanos. En las muestras de mascotas la frecuencia de aislamiento fue baja (11.1%), esto se atribuye a la dificultad de la toma de muestra, ya que todas las mascotas ponen resistencia al momento de tomar la muestra de manera que esta no se obtuvo adecuadamente.

De las muestras de suelo no se aisló ninguna cepa de *S. aureus*, a pesar de que se reporta que su presencia es posible, sin embargo, no se le considera un hábitat común de esta bacteria (42,56). En el caso de las muestras de salchicha, chorizo y crema, se obtuvo una frecuencia de aislamiento baja (14.3%, 22%, 25% respectivamente) lo cual se atribuye al proceso de elaboración que llevan. En muestras de otros alimentos procesados como el jamón (43.7%) y el tocino (51.8%) la elevada frecuencia de aislamiento se atribuye a una posible contaminación cruzada por el manejo del alimento (se venden rebanados) que a un proceso poco efectivo (26). En la leche pasteurizada no

se aisló ninguna cepa de *S.aureus*, esto significa, que la pasteurización sí resulta un proceso efectivo para eliminarlo y que la leche muestreada sí cumple con la Norma Oficial Mexicana (36). En los alimentos preparados tampoco se aisló *S.aureus* (0/15), por lo que estas muestras se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la Norma Oficial Mexicana a pesar de haber sido obtenidas en lugares de dudosa higiene (35).

En los quesos frescos se presentó una frecuencia de aislamiento elevada (54.9%). La norma indica que la leche utilizada para la fabricación de quesos debe estar previamente pasteurizada, y en la cual ya comprobamos que no hay presencia de *S.aureus* (35). Este hecho nos indica que en algún momento del proceso, el queso se contaminó, ya sea por el equipo utilizado o por las personas involucradas en su fabricación, lo cual no es raro porque en su mayoría, la fabricación de quesos frescos requiere de mucha manipulación como en el caso del queso tipo Oaxaca o el queso rallado (43). En muestras de alimentos frescos como el pollo (42.9%), la carne molida (43.5%) y los vegetales (46%), la frecuencia de aislamiento fue alta, la presencia de *S.aureus* en estos alimentos puede deberse a la manipulación o por su exposición al ambiente, ya que en la mayoría de los lugares donde se venden (Vg. mercados) se les manipula mucho y se mantienen al aire libre sin refrigeración (26).

Actualmente se reporta que más de un 90% de las cepas de *Staphylococcus aureus*, resultan resistentes a la penicilina (26). En la comparación estadística por origen de aislamiento realizada en este estudio se encontró que los porcentajes de cepas resistentes oscilan en este valor, tanto en la comparación por origen como en la de tipo de alimento el valor de p resultó mayor del nivel de significancia 0.05, por lo que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de resistencia comparados y en este caso podemos señalar que la resistencia es independiente del origen. Por el alto porcentaje de resistencia que *S.aureus* presenta a la penicilina, este antibiótico ha dejado de ser una opción para el tratamiento de una infección estafilocócica de cualquier tipo (30).

En estudios realizados en hospitales de la ciudad de México se reporta un aumento en la resistencia de *S.aureus* a la dicloxacilina, oscilando entre un 10% y 26% de cepas resistentes a este antibiótico (1,39). La resistencia encontrada en las cepas aisladas de portadores sanos y enfermos cayó dentro de este rango, sin embargo, las de origen alimentario presentaron un mayor porcentaje de resistencia. Al observar la gráfica de comparación por tipo de alimento vemos que, con excepción de las cepas aisladas de pollo que no presentaron resistencia, los porcentajes de resistencia en todos los casos fueron muy altos (arriba del 30%), esto se atribuye al uso de antibióticos en los animales, en donde se utilizan con diversos objetivos como lo es el tratamiento de animales infectados (diarrea, inflamación pulmonar, abscesos, bacteriemia, mastitis en vacas lecheras), profilaxis y para inducir el crecimiento del animal (52).

Como consecuencia tenemos un aumento en la resistencia a los antibióticos en cepas encontradas en productos de carne y leche. En la comparación por origen y tipo de alimento para la dicloxacilina, los valores de p se encuentran por debajo del nivel de significancia lo que indica que sí hay diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de resistencia comparados, por lo que aquí la resistencia presentada depende del origen de la cepa. La alta incidencia de cepas resistentes a la dicloxacilina es de seria importancia ya que este es un antibiótico β -lactamasa resistente similar a la meticilina y se reporta que las cepas resistentes a la meticilina son resistentes a este antibiótico aunque no se ha reportado que las cepas resistentes a la dicloxacilina lo sean a la meticilina.(30) La resistencia presentada ante la pefloxacina fue baja, el análisis estadístico nos indica que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de resistencia comparados, lo que nos indica que la resistencia es independiente del origen

de aislamiento. Sin embargo, en todos los orígenes se observó un porcentaje de sensibilidad intermedia por arriba del 20%.

Las cepas de sensibilidad intermedia necesitan de una concentración más elevada de antibiótico y un tiempo de tratamiento más prolongado, por lo que este antibiótico deja de ser de elección para un tratamiento, ya que podría afectar al paciente por efectos secundarios (30). La pefloxacin a aún se considera efectiva ante *S.aureus* no resistentes a la metilicina, aunque su uso es un poco restringido, ya que no se debe administrar a niños y adolescentes, además de que ocasiona tendinitis con facilidad (53). La resistencia a la cefuroxima resultó muy baja en casi todos los casos, es de notarse que el mayor porcentaje de resistencia para este antibiótico fue registrado en las cepas de alimentos como el chorizo y el tocino (16.7% y 21.4% respectivamente) los cuales son productos de carne y, como ya se mencionó antes, éstos pueden presentar mayor resistencia a los antibióticos por su uso en animales (52). No obstante, el análisis estadístico indica que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de resistencia por lo que ésta se considera independiente del origen. La cefuroxima aún se considera un bactericida muy efectivo ante *S.aureus*, ya que es un antibiótico β -lactamasa resistente, aunque no es efectivo ante un MRSA (53).

En estudios realizados en la Ciudad de México se reporta que *S.aureus* presenta una resistencia a la gentamicina del 11% (15). En este estudio no se observó un porcentaje de resistencia mayor a esto en cepas de ningún origen. El mayor porcentaje de resistencia se observó en cepas de origen ambiental (7.7%), sin embargo, según el análisis estadístico no hay diferencias significativas en comparación a los otros valores. En este caso la resistencia resulta independiente del origen.

En la comparación por tipo de alimento no se observó resistencia. La gentamicina es uno de los antibióticos utilizados para evitar y controlar infecciones posquirúrgicas, el *S.aureus* se considera una de las causas más importantes (53). En el Hospital Infantil de México Federico Gómez, un estudio reporta una resistencia a la cefotaxima de entre 11% y 27% en cepas de portadores sanos y enfermos (1). En este estudio se encontró una resistencia a este antibiótico del 5.3% en cepas aisladas de portadores sanos, 5.1% en cepas de origen alimentario y 7.7% en cepas de origen ambiental. En este caso el análisis estadístico indica que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de resistencia, por lo que podemos afirmar que la resistencia a este antibiótico es independiente del origen. Aunque la resistencia a la cefotaxima es baja, se observan porcentajes de sensibilidad intermedia muy altos; como se mencionó antes, estas cepas necesitarían una mayor concentración del antibiótico y tiempo de exposición más prolongado, sin embargo, debido a estas dos variables este antibiótico deja de ser de primera elección (30). Los efectos secundarios de la cefotaxima incluyen colitis pseudomembranosa y shock anafiláctico (53).

En estudios de susceptibilidad realizados con trimetoprima-sulfametoxazol se reporta que hasta un 28% de cepas de origen nosocomial resultan resistentes a este antibiótico (39). Lo observado en este estudio difiere con lo reportado ya que no se observó resistencia en ningún origen. Cabe resaltar que la resistencia reportada en cepas de origen nosocomial es generalmente mayor a la de cepas de cualquier otro origen, no obstante es difícil hacer una comparación con cepas provenientes de cada origen ya que en la mayoría de los casos no hay información disponible. La combinación de estos antibióticos se considera efectiva incluso ante una cepa resistente a la metilicina, sin embargo, algunos de sus efectos secundarios, como el síndrome de Stevens-Johnson y su precipitación en los riñones, la ponen como última opción ante una cepa resistente a otros antibióticos (30,53).

Para la tetraciclina se observó que la resistencia, comparando por origen de aislamiento, no sobrepasó el 16%. En esta comparación el análisis estadístico nos indica

que la resistencia hacia este antibiótico es independiente del origen. Comparando por tipo de alimento se observó que las cepas aisladas a partir del jamón, el tocino y el pollo presentan un porcentaje de resistencia a la tetraciclina alto (28.57%, 33.33% y 57.14% respectivamente). Si bien la tetraciclina es uno de los antibióticos más usados en los animales (52), en este caso se puede decir que el origen de estas cepas resistentes es presumiblemente humano, ya que en otros tipos de alimentos provenientes de animales como la carne molida, el chorizo y la salchicha no se presentaron cepas resistentes y los tres alimentos que sí presentaron resistencia son aquellos que sufren mayor manipulación.

En esta comparación el análisis estadístico indica que la resistencia a la tetraciclina es dependiente del tipo de alimento. La resistencia a la ampicilina está ampliamente difundida, se reporta que arriba del 90% de las cepas de *S.aureus* son resistentes a este antibiótico (1), lo cual se pudo comprobar en este estudio ya que el 88.8% de las cepas lo fue. En esta comparación el análisis estadístico no mostró diferencias significativas, por lo que la resistencia a este antibiótico se considera independiente del origen. Del mismo modo que la penicilina, la ampicilina ha dejado de ser un antibiótico de elección para tratar una infección por *S.aureus* gracias al elevado porcentaje de resistencia que presenta (30). Para la eritromicina se reporta que la resistencia es de un 35% en cepas nosocomiales (1). En este estudio se encontró a la mayoría de los porcentajes de resistencia por debajo de este valor. Sin embargo, en el caso de los portadores enfermos, la resistencia observada se sale por completo de este parámetro ya que fue del 80%. En esta comparación, el análisis estadístico indica que hay diferencias significativas, por lo que la resistencia hacia la eritromicina es dependiente del origen del aislamiento. La eritromicina es un antibiótico ampliamente usado, se le considera el antibiótico de elección para el tratamiento de *S.aureus* resistente a la penicilina (53).

En el caso de la ceftazidima, en el Centro Médico "La Raza" se reporta un 80% de resistencia en cepas de origen nosocomial (1). En este estudio se encontró una alta resistencia a la ceftazidima, en algunos casos hasta del 100%. Aquí, el análisis estadístico nos indica que las diferencias nos son significativas, por lo que la resistencia a la ceftazidima se considera independiente de su origen. La ceftazidima es el antibiótico más usado frente a infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* y se le considera poco activa frente a cocos gram-positivos, por lo que no se usa con frecuencia para el tratamiento de *S.aureus* (30,53). La resistencia de *S.aureus* a este antibiótico puede haber sido adquirida de manera cruzada durante el tratamiento para otra bacteria.

En el caso de la cefalotina, en el Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán se reporta una resistencia del 7%, en cepas de portadores sanos y enfermos (15). En este estudio se observó una resistencia muy baja a la cefalotina. El porcentaje de resistencia más alto se observó en el queso en donde fue de 3.5%. De acuerdo con análisis estadístico, las diferencias no son significativas por lo que la resistencia a este antibiótico es independiente del origen. La cefalotina se considera un antibiótico efectivo ante *S.aureus* β -lactamasa resistente (53).

CONCLUSIONES

- La resistencia que presenta *S.aureus* a la dicloxacilina, eritromicina y tetraciclina resultó dependiente del origen de aislamiento; esto nos indica que el amplio uso de estos antibióticos en los animales se traduce en la selección y diseminación de cepas resistentes con sus productos (carne, leche, embutidos, etc.), por lo que la resistencia presentada es propia del origen de aislamiento.
- La resistencia presentada a otros antibióticos como lo son la penicilina, pefloxacina, cefuroxima, gentamicina, cefotaxima, tetraciclina, ampicilina, ceftazidima y cefalotina resultó independiente del origen de aislamiento, lo que nos habla de que los genes de

resistencia están ampliamente difundidos en las cepas de *S.aureus* sin importar si son cepas nosocomiales o comunitarias.

REFERENCIAS

1. Alpuche C., C. Avila, F.L. Espinoza de los Monteros, D. Gómez Barreto, J. I. Santos Preciado. "Patrón de sensibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* en un hospital pediátrico: prevalencia de resistencia a meticilina". *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, vol. 46, núm.11, p. 700-704, 1989.
2. Barriga G., L. Rojas, M.A. Peredo. "Actualidades en los patrones de resistencia a los antimicrobianos en un centro médico nacional". *Rev. Mex. Patol. Clin.*, vol. 48, núm.2, p. 65-69, 2001.
3. Bennett R.W., G.A. Lancette. *Staphylococcus aureus*". *Bacteriological Analytical Manual Online U.S. Food & Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition*. [en línea] URL: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html>, 10/3/2002.
4. Bennett, R.W. *Staphylococcus aureus*. En: *Bacteriological Analytical Manual*. 6^{ta} Edición. AOAC, E.U. 1984.
5. Bennett, R.W. "*Staphylococcus aureus* identification characteristics and enterotoxigenicity", *J. Food Sci.*, vol. 51, núm. 5, pp.1337-1339, 1986.
6. Bergdoll M. S. Staphylococcal Food Poisoning. En: Cliver D. O. *Foodborne Diseases*. Academic Press, Londres, pp. 85-106, 1990.
7. Bergdoll M.S. "*Staphylococcus aureus*" En: *Foodborne Bacterial Pathogens*, Marcel Dekker, Nueva York. pp. 463-523, 1990.
8. Berger-Bächi B. "Genetic Basis of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*", *Cell. Mol. Life Sci.*, vol.56, pp. 764-770. 1999.
9. Conly, J. "Antimicrobial Resistance in Canada". *Can. Med. Assoc. J.*, vol. 167, núm. 8, pp.885-891, 2000.
10. Degroot-Kosolcharoen, J., M. King, L. Lambert. "Resolver el rompecabezas de la infección mediante las pruebas de cultivo y sensibilidad". *Nursing*, pp. 17-22, marzo 1997.
11. Dekker F.J., M.R. Breach. "Agentes quimioterápicos". En: *Manual de técnicas de microbiología médica*. Acribia, España, pp. 407-457, 2002.
12. Dekker F.J., M.R. Breach. "Pruebas de sensibilidad a los antibióticos". En: *Manual de técnicas de microbiología médica*. Acribia, España, pp. 437-457, 2002.
13. Dinges, M.M., P.M. Orwin, P.M. Schlievert. "Exotoxins of *Staphylococcus aureus*". *Clin. Microbiol. Rev.* vol.13, núm.1, pp.16-34, 2000.
14. Finegold, S.M., E.J. Baron. "Micrococcaceae: estafilococos y micrococos". En: Bailey & Scott Diagnóstico microbiológico. 7^{ma} Edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, pp. 339-347, 1989.
15. Foster, T. "*Staphylococcus*". En: Baron, S, R. C. Peake, T. Albrecht *et al* (ed.) *Medical Microbiology*. Libro en línea:

URL:<http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch012.htm>, 27/09/02. University of Texas Medical Branch, UTMB, Galveston, 1996.

16. Giraud, M.C. *et al.* "Patrones de Susceptibilidad a 19 antimicrobianos de gérmenes aislados de hemocultivos en un hospital de referencia de la ciudad de México". *Rev. Invest. Clin. Mex.*, vol.38, núm. 1, pp. 7-14, 1986.
17. Graves-Woodward, K., R.F. Pratt. "Interactions of Soluble Penicillin-binding Protein 2a of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Moenomycin". *Biochemistry*, vol.38, pp.10533-10542, 1999.
18. Hartman, B.J., A. Tomasz. "Low Affinity Penicillin-binding Protein Associated with β -lactam Resistance in *Staphylococcus Aureus*". *J. Bacteriol.*, vol. 158, núm. 2, pp. 513-516, 1999.
19. Jablonski, L.M. "*Staphylococcus aureus*". En Bohach Doyle, M.P., L. R. Beuchat, T. J. Montville *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. American Society for Microbiology*, Washington, D.C., pp. 353-375, 1997.
20. Jawetz, E. *et al.* "Estafilococos". En: *Microbiología Médica. El Manual Moderno*, México, D.F., pp. 188-193, 1990.
21. Johnson, R., P. Kuby. *Aplicaciones de ji-cuadrada*. En: *Estadística Elemental*. pp. 425-459, 2^{da} Edición. Thomson Editores, México1999.
22. Kluytmans, J., A. Van Belkum, H. Verbrucgh. "Nasal Carriage of *Staphylococcus Aureus*: Epidemiology, Underlying Mmechanisms, and Associated Risks". *Clin. Microbiol. Rev.* vol.10, núm. 3, p. 505-520, 1997.
23. Lapage S.P., J.E. Shelton, T.G. Mitchell. "Culture Collection and the Preservation of Bacteria". En: *Methods in Microbiology. Academic Press*, vol. 3, Londres, 1970.
24. Levy, S.B.. "La resistencia contra los antibióticos". *Investigación y Ciencia*, pp.14-21, mayo 1988.
25. Lyon, B., R. Skurray. "Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus Aureus*: Genetic Basis". *Microbiol. Rev.* vol. 51, núm.1, pp. 88-134, 1987.
26. Macfaddin J.F. "Prueba de Catalasa. Prueba de la Coagulasa". En: *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Editorial Médica Panamericana*, México D. F., 1990.
27. Martin, S.E., *et al.* "*Staphylococcus*", En: R.K. Robinson, C.A. Bat, P.D. Patel *Encyclopedia of Food Microbiology*. vol. 3, Academic Press, pp. 2062-2083, Londres, 2000.
28. Mateos, P.F. "Agentes antimicrobianos y microorganismos". *Departamento de Microbiología y Genética, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca*. (en línea) **URL:**http://edición-micro-usal.es/web/educativo/m_especial/14principal.htm, 14/0/6/03
29. Mazel, D., J. Davies. "Antibiotic Resistance in Microbes". *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 56, pp. 742-754, 1999.
30. Mehrotra, M,G. Wang, W.M. Johnson. "Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome

- Toxin 1, and Methicillin Resistance". *J. Clin. Microbiol.*, vol.38, núm.3, p.1032-1035, 2000.
31. Mensa, J., J.M. Gatell, M. Corachán. "Guía de Terapéutica Antimicrobiana". 4^{ta} Edición. *Ediciones Científicas y Técnicas S. A.* Barcelona, España, 1994.
 32. Mulligan, M.E., et al. 1993. "Methicillin-resistant *S.aureus*: A Consensus Review of the Microbiology, Pathogenesis and Epidemiology with Implications for Prevention and Management". *Am. J. Med.*, vol. 94, pp.313–328.
 33. Murray, B.E. "New Aspects of Antimicrobial Resistance and the Resulting Therapeutic Dilemmas". *J. Infect. Dis.*, vol.163, pp. 1185-1194, 1991.
 34. Neu, H. "The Crisis in Antibiotic Resistance". *Science*, vol. 257, pp. 1064-1073, 1992.
 35. Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Secretaría de Salud, México.
 36. Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. Secretaría de Salud, México.
 37. Norma Oficial Mexicana NOM-184-SSA1-2002, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias. Secretaría de Salud, Mexico.
 38. Norma Oficial Mexicana NOM-185-SSA1-2002, Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias.
 39. Novick, R.P. "Estafilococos". En: Davis, B. D., R. Dulbecco, H. N. Eisen, H. S. Ginsberg (ed). *Tratado de Microbiología*, 4^{ta} Edición, Masson, S.A. pp. 519-539, Barcelona, 1996.
 40. Páez Páez, H. "*Staphylococcus aureus*: Sensibilidad a los Antibióticos". Evolución durante 1990-1995. *Rev. Mex. Patol. Clin.*, vol. 44, núm.1, pp. 21-22, 1997.
 41. Peacock Jr., J.E., D.R. Moorman, R.P. Wenzel, G.L. Mandell. "Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Microbiologic Characteristics, Antimicrobial Susceptibilities, and Assessment of Virulence of an Epidemic Strain". *J. Infect. Dis.*, vol. 144, núm.6, pp. 575-582, 1981.
 42. Rang, H.P., M.M. Dale, J.M. Ritter, P. Gardner. "Basic principles of chemotherapy". En: *Pharmacology*. 3^{ra} Edición, pp. 719-743, Churchill Livingstone, N. Y., 1995.
 43. Roberts, T.A., A.C. Baird-Parker, R.B. Tompkin. "*Staphylococcus aureus*. En: *Microbiología de los alimentos*. Características de los patógenos microbianos, pp. 349-385, Acibia, España, 1988.
 44. Schmidt, K. F. "Recetas para preparar quesos de pasta blanda". En: *Elaboración artesanal de mantequilla, yogur y queso.*, pp. 39-52, Editorial Acibia, España, 1988.

45. Schmitz, F.J. *et al.* "Development of Resistance to Ciprofloxacin, Rifampin, and Mupirocin in Methicillin-susceptible and –resistant *Staphylococcus Aureus* Isolates". *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, núm.11, pp. 3229-3231, 2000.
46. Seeley, H.W., P.J. Van Demark. "Tinción de los microorganismos". En: *Microbios en acción. Manual de laboratorio para microbiología*. pp. 27-41. Editorial Blume, España, 1973.
47. Sefton, A.M. "Mechanisms of Antimicrobial Resistance, Their Clinical Relevance in the New Millennium". *Drugs*, vol. 62, núm. 4, pp. 557-566, 2003.
48. Shanahan, M.A., *et al.* "The Prevalence of Antimicrobial Resistance in Human Faecal Flora in South Africa". *Epidemiol. Infect.*, núm. 111, pp. 221-228, 1993.
49. Sheagren, J.N. "Staphylococcus Aureus: The Persistent Pathogen". *N. Engl. J. Med.*, vol. 310, núm. 21, pp. 1368-1373, 1984.
50. *Staphylococcus Aureus* Resistant to Vancomycin – United States 2002. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, vol. 51, núm. 26, pp. 565-567, 2002.
51. *Staphylococcus Aureus*", *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook*. U.S. Food & Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition, (en línea) URL: <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap3.html>, 27/9/02.
52. Sykes, R.B., M. Mathew. "The β -lactamase of Gram-negative Bacteria and Their Role in Resistance to β -lactam Antibiotics". *J. Antimicrob. Chemother.*, núm. 2, pp. 115-157, 1976.
53. Teuber M. "Spread of Antibiotic Resistance with Food-borne Pathogens". *Cell. Mol. Life. Sci.*, núm. 56, pp. 755-763, 1999.
54. Thomson. PLM Latina. [En línea]
URL:<http://www.facmed.unam.mx/bmnd/plm/otros/default.htm>, 1 septiembre 2003.
55. Todar, K. "Antimicrobial agents used in treatment of infectious diseases". University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. [en línea]
URL:<http://www.bact.wisc.edu/Bact330/lectureama>, 27 septiembre 2002.
56. Trakulsomboon, S., *et al.* "First Report of Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin in Thailand. *J. Clin Microbiol.*, vol. 39, núm. 2, pp. 591-595, 2001.
57. Varnam V.H., M.G. Evans. "*Staphylococcus aureus*". En: *Foodborne pathogens: an illustrated text.*, Wolfe Publishing, pp. 235-265, Londres, 1991.

Gnathostomiasis humana

Abordaje, diagnóstico y tratamiento

Oscar Vázquez Tsuji
Investigador y docente de la Facultad Mexicana de Medicina
Universidad la Salle

Teresita Campos Rivera
Departamento de Parasitología y Micología
Instituto Nacional de Pediatría

Adrián Rondán Zárate
Investigador y docente de la Facultad Mexicana de Medicina
Universidad la Salle.

[Recibido: Noviembre de 2005. Aceptado: Diciembre de 2005](#)

RESUMEN

La Gnathostomiasis en México es causada por helmintos del género *Gnathostoma*. Durante mucho tiempo se pensó que esta enfermedad era rara y esporádica en México. La gnatostomiasis es una infección sistémica causada por la migración de larvas del nemátodo *Gnathostoma*. Esta parasitosis se considera como una zoonosis que involucra una gran variedad de animales que funcionan como huésped intermediario y definitivo del parásito. El consumo de pescado crudo es el factor de riesgo más importante.

Palabras claves: gnatostomiasis humana, infectología, parasitosis

ABSTRACT

Gnathostomiasis in Mexico is caused by *Gnathostoma* sp. For a long time this disease was considered rare and sporadic in Mexico. Gnathostomiasis is a systemic infection caused by migrating nematode larvae of *Gnathostoma*. This parasitic disease is a zoonosis involving a wide variety of animals as intermediate and definitive hosts. Consumption of raw fish is the main risk factor.

Key words: human gnathostomiasis, infectology, parasitosis disease

DEFINICIÓN

La gnatostomiasis es una zoonosis parasitaria causada por nemátodos del género *Gnathostoma*, el humano adquiere la infección al ingerir pescado crudo o mal cocido proveniente de agua dulce que se encuentre infectado con larvas de *Gnathostoma* tipo L3. Debido a que el humano es un huésped accidental el parásito no completa su ciclo biológico y sus larvas producen en el humano alteraciones cutáneas, oftalmológicas, neurológicas y viscerales (1,2).

SINONIMIAS

La forma cutánea se conoce también como edema migratorio eosinofílico, paniculitis nodular migratoria eosinofílica, paniculitis migratoria, paniculitis nodular eosinofílica o larva migrans por *Gnathostoma* (3).

En países asiáticos como China, Japón e India se conoce como edema de Quinke, Reumatismo de Shanghai, Enfermedad del Consulado de Nangching, edema del Nangching, edema de la rivera del Yang Tse o choko fushu, y en Tailandia se conoce como Tua-chid que significa tumor doloroso (3).

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La primera descripción del nematodo fue hecha por Sir Richard Owen en 1836 en Londres, Inglaterra, al realizar la autopsia de un tigre, creó el género *Gnathostoma* y lo denominó como *Gnathostoma spinigerum* (4).

En 1872, Fedchenko identificó en el estómago de un cerdo silvestre y en el de un cerdo doméstico; el primero proveniente de Turquía y el segundo de Hungría al parásito adulto al cual describió como *G. hispidium* (5).

En humanos la primera descripción la realizó Levinsen, en 1889, en una mujer tailandesa. En 1902, en japoneses residentes en China, se describió una enfermedad denominada edemas del Yang Tse o choko fushu. Tubangui, en Filipinas en 1925, describió al parásito adulto hembra de *Gnathostoma doloresi* en el estómago de un cerdo y, en 1930, Malpestone hizo la descripción de un parásito adulto macho también en el estómago de un cerdo proveniente de la India (6).

En los años de 1933 a 1937 Prommas y Daengsvang dilucidaron el ciclo de vida de *Gnathostoma*. Miyazaki, entre 1951 y 1953, encontró parásitos de *G. doloresi* en jabalíes. En 1984, Ollague-Loaiza la designaron como paniculitis nodular migratoria eosinofílica y reportaron los primeros casos en Ecuador (3).

Entre los años de 1988 y 1989 Nawa y cols, y Ogata y cols, describieron los primeros casos humanos causados por *G. doloresi*. Posteriormente se han seguido reportando casos que se han relacionado con el consumo de algunas especies de peces así como con el consumo de serpientes del género *Agkistrodon halyz* (5).

Parásitos adultos de *G. niponicum* se han aislado del esófago de comadrejas, correspondiendo a Yamaguti la descripción morfológica. Sin embargo, se desconoce su ciclo biológico. Los primeros casos humanos debidos a esta especie se reportaron entre 1988 y 1991 por Ando y cols. (2).

En México, Caballero identificó por primera vez, en 1958, al nematodo adulto en tlacuaches en Jaltenango, Chiapas. Los dos primeros casos de enfermedad en México y en América reportados en humanos corresponden a Peláez y Pérez Reyes, en 1970, en dos personas de Sinaloa. Posteriormente, en 1986, fue identificado el primer foco endémico en México por Martínez Cruz, correspondiendo a las inmediaciones de la cuenca del río Papaloapan; en 1989, él mismo reportó nuevos casos de gnatostomiasis en humanos (1).

AGENTE ETIOLÓGICO

El agente etiológico es un nemátodo del género *Gnathostoma*, se han involucrado como causantes de la enfermedad: *G. spinigerum*, *G. doloresi*, *G. binucleatum*, *G. hispidium* y *G. nipponicum*. El parásito se encuentra incluido dentro de la superfamilia Spiruroidea (2). Véase Cuadro 1.

Cuadro 1

Phylum:	Nemathelminthes
Clase:	Nematoda (Rudolphi 1808)
Orden:	Eunematoda Ward 1916)
Superfamilia:	Spiruroidea (Raillet y Henry 1915)
Familia:	Gnathostomatidae (Raillet 1895)
Subfamilia:	Gnathostominae (Baylis y Lane 1928)
Género:	<i>Gnathostoma</i> (Owen 1836)

MORFOLOGÍA DEL PARÁSITO

El adulto macho *Gnathostoma spinigerum* mide de 16 a 40 mm de largo por 1 a 3 mm de ancho, la hembra mide entre 13 a 55 mm de diámetro. Ambos tienen cuerpos cilíndricos, el extremo anterior se encuentra formado por un bulbo cefálico, con 7 a 9 hileras transversas de ganchos y con 20 a 131 ganchos en cada hilera. La mitad anterior a las dos terceras partes del cuerpo se encuentra cubierto con numerosas filas de espinas que gradualmente disminuyen en densidad y tamaño hacia el extremo posterior hasta ser apenas perceptibles o estar ausentes. Las espinas cuticulares varían en tamaño y forma dependiendo de su localización en el cuerpo. Miden 62 mm de longitud. La cutícula tiene 5 a 10 mm de grosor y estrías transversales. El esófago se compone de una porción muscular anterior y una larga porción glandular posterior. Las células intestinales están cubiertas por microvellosidades prominentes. Contienen pigmentos glandulares y tienen de 2 a 8 núcleos. Los adultos de ambos sexos tienen dos pares de sacos cervicales en la porción anterior. Los machos adultos tienen un solo testículo y 2 espículas copulatorias y un para de papilas. Las hembras adultas tienen un par de ovarios y una vulva en la mitad posterior del cuerpo (2-7).

Los huevos de *G. spinigerum* no están embrionados cuando son expulsados con la materia fecal de los huéspedes definitivos. Tienen forma oval, presentan un tapón mucoso en un extremo y miden 56 x 79 mm de largo por 34 a 43 mm de ancho (4).

Las larvas de tercer estadio avanzado de *G. spinigerum* son pequeñas miden de 3 a 4 mm de largo por 630 mm de grueso y sólo tienen 4 hileras transversas de ganchos cefálicos, con un promedio de 42 a 49 ganchos por hilera. El cuerpo de la larva está cubierto con más de 200 hileras transversas de pequeñas y sencillas espinas que disminuyen en tamaño y densidad hacia el extremo posterior (7). Véase *Figura 1*.

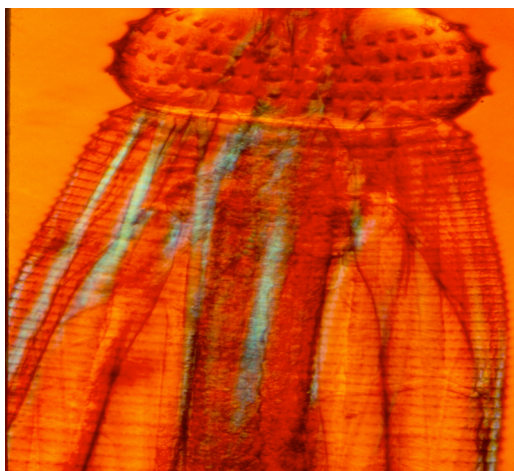


Figura 1. Larva de tercer estadio de *Gnathostoma spinigerum*. Nótese la presencia de hileras de ganchos cefálicos. Microscopía de campo claro. 10X

Foto cortesía Dr. Manuel Gutiérrez Quiroz .

CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de *Gnathostoma* involucra diferentes huéspedes definitivos, intermediarios y paraténicos. Entre los huéspedes definitivos se encuentran perros, gatos, cerdos, felinos silvestres, tlacuaches, mapaches, nutrias. Los huéspedes intermediarios corresponden a diversas especies de crustáceos y peces de agua dulce y entre los paraténicos se encuentran algunas especies de aves ictiófagas, anfibios y reptiles.

El ciclo biológico inicia cuando el huésped definitivo expulsa los huevos del parásito junto con la materia fecal, que al ser depositada en agua de lagos, ríos o presas con temperatura que varía de 24 a 28°C, los huevos fértiles pasan por un proceso de embriogénesis que da por resultado la formación de una larva de primer estadio (L₁), en un lapso relativamente corto se lleva a cabo la primera ecdisis o muda que da origen a una larva rhabditoide de segundo estadio (L₂) que eclosiona del huevo a través del opérculo para desplazarse libremente en el agua.(2,4,7) El proceso dura aproximadamente 7 días. Posteriormente la larva es ingerida por pequeños crustáceos (copépodos) de los géneros *Cyclops*, *Acantocyclops*, *Mesocyclops*, *Ancyracanthocyclops*, *Eucyclops*, *Tropocyclops* sp., que corresponden a los huéspedes intermediarios primarios. En el tubo digestivo del crustáceo la larva L₂ pierde la vaina y emigra hacia el hemocele donde muda a larva de tercer estadio temprana (L₃T), período que dura aproximadamente de 7 a 10 días.

Los copépodos sirven de alimento a los segundos huéspedes intermediarios peces de agua salada o dulce. En el estómago de estos huéspedes la larva L₃T atraviesa la pared gástrica o intestinal y migra hacia las masas musculares donde adquiere la forma de larva de tercer estadio avanzada (L₃A). Esta etapa que tiene aproximadamente 1 mes de duración. La larva muda cuando los peces infectados son depredados por los huéspedes definitivos y se transforma en larva de cuarto estadio (L₄), sufriendo una nueva muda para convertirse en gusano adulto y alojarse en su hábitat definitivo: las criptas del esófago o en la pared del estómago en cavidades formadas por células hiperplásicas infiltradas por un exudado inflamatorio, donde alcanza la madurez sexual, realiza la cópula y la hembra inicia la postura de huevos.(7)

Al ser depredados, los peces infectados con la larva L₃A, por animales que no son los huéspedes definitivos habituales, los parásitos no alcanzan la etapa adulta, desarrollando el fenómeno conocido como paraténesis (1,2).

La larva L₃A que se encuentra en los peces infectados, generalmente es la forma infectante para el hombre, cuando ingiere peces infectados con larva L₃A, ya sea en la forma de cebiche, sushi o sashimi se convierte en huésped accidental completándose así la zoonosis (1).

En México, la especie que más se ha relacionado con la gnatostomiasis humana es *G. spinigerum*, y los peces que se han identificado como fuente de infección para el humano son: mojarra tilapa (*Oreochromis* spp.), mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*), chucumite (*Centropomus parallelus*), cuatete (*Cathorops* spp y *Ariopsis* spp), guavina (*Gobiomorus dormitor*) popoyote (*Dormitator latifrons*) (7).

La cronicidad de las manifestaciones clínicas se puede explicar por la larga sobrevivencia que puede llegar a tener la larva que es de hasta 16 años. Cabe mencionar que la larva muere a los 5 minutos de cocción de la carne al hervirla, en vinagre sobrevive 5 horas y en limón logra sobrevivir hasta durante 24 horas (4).

EPIDEMIOLOGÍA

La gnatostomiasis es una zoonosis parasitaria endémica en el Sureste de Asia, los países más afectados son Tailandia y Japón. También se han descrito casos en Singapur, China, India, Indochina, Indonesia, Vietnam, Filipinas y Java, así como en Australia. En América se han reportado casos en México, Ecuador, Brasil y Argentina. En Estados Unidos se han reportado casos en inmigrantes asiáticos. En Europa también se han reportado casos que son exportados de zonas endémicas como consecuencia de vacacionistas que acuden a estas áreas de alta endemia (6).

En nuestro país la enfermedad es considerada como relativamente nueva. Se han identificado casos en estados como Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Guerrero, Oaxaca, Tamaulipas, Veracruz, Distrito Federal, Tabasco y Baja California Norte. Las principales zonas endémicas son: La presa Miguel Alemán Valdés en Temascal, Oaxaca; el río Papaloapan en Cosamaloapan, Veracruz; la presa Adolfo López Mateos en el Varejonal en Culiacán, Sinaloa; el río Pánuco en Tampico, Tamaulipas; y, en Río Grande de Santiago en Tepic, Nayarit (5,7).

Son múltiples los reportes de casos diagnosticados de gnatostomiasis en México por diferentes autores como Barcelata, quien en 1988 informó del caso de un niño de 7 años oriundo de Tierra Blanca, Veracruz, que presentó gantostomiasis en el ojo izquierdo. Vázquez Maya y Espinoza reportaron, en 1993, otro caso ocular en el ojo izquierdo, procedente de Usapanapa, Veracruz. En este mismo año Funata y cols, en Estados Unidos, reportaron un caso también de localización ocular de una mujer que estuvo de vacaciones en Acapulco. Para 1996, Messina-Robles, en el XII Congreso Nacional de Parasitología efectuado en Aguascalientes, Ags, reportó 656 casos en Tepic, Nayarit. En el año 2001, Magaña y Messina Robles reportaron 934 casos más.

En el estado de Nayarit se han ido incrementando los casos, dato que se confirma con los reportes que tiene la Secretaría de Salud, que para 1998 registró más de 1,000 casos en todo el estado; en 1999 registró 1,090 casos, para el año 2000 registró 1,453 casos y hasta junio de 2001 tenía registrados 465 casos más. Es conveniente comentar que no todos han sido confirmados mediante estudios inmunológicos o histológicos. No así, en el estado de Sinaloa en donde, desde 1991, la mayoría de los casos registrados han tenido confirmación inmunológica mediante el antígeno de *Gnathostoma doloresi*. En 1996 Martínez Cruz informó de 440 casos en la cuenca del río Papaloapan. Rojas y cols, en Acapulco, Guerrero desde 1991 han reportado más de 100 casos (2,5,7).

En el trabajo realizado por Ogata y cols, estimaron que en México, hasta 1996, se habían registrado 1,380 casos, de los que sólo algunos tuvieron confirmación inmunológica mediante antígenos de *G. doloresi*, *G. spinigerum* y *G. hispidium*, siendo casos provenientes de Temascal y Culiacán. En la mayoría el diagnóstico se hizo clínicamente. Actualmente se siguen reportando casos aislados en Tabasco, Hidalgo, Jalisco y Aguascalientes (6).

Asimismo, en los estados de Yucatán, Michoacán, Morelos, Colima y Chiapas se han identificado los parásitos adultos o larvas de *Gnathostoma* en animales domésticos y silvestres. En 1990, Ortiz y Villaseñor reportaron el primer caso de *G. procyonis* en el estómago de tlacuaches procedentes de Tepoztlán, Morelos. En 1991, Almeida describió una nueva especie que denominó *G. binucleatum* en felinos silvestres provenientes de la cuenca del río Papaloapan, en Oaxaca-Veracruz. Además, identificó a *G. turgidum* en un tlacuache que provenía de esa misma zona (4).

Hacia el año 2001 se calculaba que había aproximadamente otros 8,000 casos registrados, por lo que se considera a la gnatostomiasis como un verdadero problema de salud pública en México, aunque realmente la casuística real se desconoce (5).

MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

Cuando el hombre ingiere pescado crudo o insuficientemente cocido con la larva L₃A de *Gnathostoma*, ésta se libera en el estómago, perfora la pared gástrica para alcanzar el hígado y de aquí puede dirigirse a cualquier sitio de la economía, siendo la piel del tórax y el abdomen los sitios más frecuentemente afectados (1,2).

Los mecanismos patogénicos de *Gnathostoma* aún son desconocidos. Sin embargo, se ha involucrado en la patogenia el efecto mecánico producido por la migración del parásito en el tejido, la eliminación de sustancias tóxicas similares a la acetilcolina, la producción de enzimas proteolíticas como la hialuronidasa y de una sustancia hemolítica, además de la respuesta inflamatoria debida a la reacción inmunológica del huésped (2,4).

En la piel las alteraciones iniciales se presentan durante los primeros días después de la infección. Se caracterizan por un infiltrado perivascular superficial y profundo con presencia de linfocitos y escasos eosinófilos; posteriormente, éstos se incrementan alrededor de los adipocitos y de los septos interlobulares, con zonas de hemorragia. En el panículo adiposo se observa un gran infiltrado inflamatorio con predominio de eosinófilos; los linfocitos son escasos y existen grandes zonas con hemorragia. Esta imagen se identifica como paniculitis nodular migratoria eosinofílica, misma que se puede presentar en otras parasitosis. Motivo por el que algunos autores no la aceptan como signo patognomónico de larva migrans por *Gnathostoma* (1-5).

Durante su migración por los tejidos del huésped *Gnathostoma* induce una respuesta inmune humoral y celular tipo Th2, con liberación de interleucinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13), así como del factor de estimulador de colonias granulocíticas y monocíticas (GM-CSF), que induce producción de IgE por las células plasmáticas, generando la producción de eosinófilos y su maduración (3,4).

CUADRO CLÍNICO

La sintomatología inicial corresponde a la migración de la larva al hígado, se presenta entre el 1° y 2° día después de haber ingerido pescado crudo infectado o bien carne infectada insuficientemente cocida proveniente de hospederos paraténicos. Se caracteriza por la presencia de dolor gástrico localizado en el hipocondrio derecho, sialorrea, náusea, vómito, urticaria y fiebre; leucocitosis leve y aumento acentuado de eosinófilos. Posteriormente la sintomatología dependerá del sitio del organismo que invada la larva. Dependiendo de la localización de la larva las manifestaciones clínicas se clasifican en cutáneas, oculares, viscerales y neurológicas (2).

Gnatostomiasis cutánea.

Las manifestaciones cutáneas se clasifican en cuatro variedades: Inflamatoria, serpiginosa, pseudofurunculosa y mixta.

a) **Inflamatoria o profunda.** También conocida como edema migratorio eosinofílico o paniculitis nodular migratoria eosinofílica, se caracteriza por la presencia de edemas migratorios intermitentes de aspecto eritematoso, indurados con aumento de la temperatura local y prurito intenso, miden de 1 a 10 cm de diámetro, no depresible a la palpación y de bordes difusos. A pesar de su aspecto la lesión no es dolorosa. En cambio, en lugar de evolucionar hacia la supuración, necrosis o curación, la lesión

empieza a desplazarse caprichosamente de 1 a 5 cm diarios. Después de un período variable (de unas horas hasta 30 días) su intensidad disminuye. Posterior a la desaparición del edema queda una zona hemorrágica que desaparece en un lapso de dos a cinco semanas; sólo para volver a presentarse con las mismas características en el mismo sitio, o en una región vecina o distante después de un período latente de semanas, meses y en ocasiones de más de un año. Esta persistencia en la recaída es muy característica de la enfermedad y puede repetirse durante años. La lesión puede aparecer en cualquier parte del cuerpo, aunque el primer brote es más frecuente en el tórax.

En esta helmintiasis no se presenta ataque al estado general, el paciente se encuentra afebril, conserva la actividad y el apetito y sólo ocasionalmente presenta un discreto malestar. Por lo anterior, es entendible que el paciente no le de importancia al padecimiento y no acuda al médico. Otras personas refieren que tienen la sensación de que algo les “camina” bajo la piel, situación que les preocupa y es el principal motivo por el que acuden a recibir atención médica (2-4).

b) **Serpiginosa o superficial.** En esta presentación y debido al desplazamiento de la larva en el tejido subcutáneo, no induce la reacción inflamatoria descrita anteriormente, sino que simplemente se presentan surcos poco sinuosos, que en el extremo por donde avanza la larva el surco es más ancho, eritematoso y pruriginoso. Las lesiones son semejantes a las que producen en el hombre las uncinarias de los perros y de los gatos *Ancylostoma caninum* y *Ancylostoma braziliensis* o las larvas de *Strongyloides stercoralis*, pero las lesiones producidas por *Gnathostoma* no son tan sinuosas, sino más anchas y rectas. Las lesiones desaparecen en un lapso de aproximadamente dos a cinco semanas. En nuestro país esta forma clínica es menos frecuente que la variedad inflamatoria (2-4). Véase *Figura 2*.

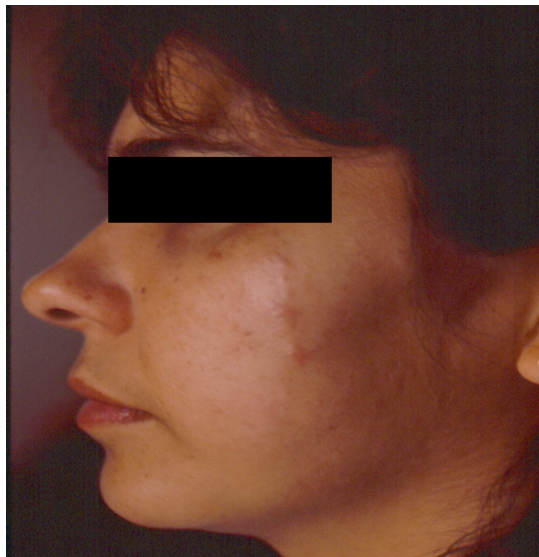


Figura 2. Gnathostomiasis serpiginosa localizada a región maxilar izquierda. Nótese la presencia de una lesión eritematosa de aspecto serpiginoso elevada ancha. Foto. Cortesía M en C. Aurora Candil Ruíz.

c) **Pseudofurunculosa.** Es una presentación poco frecuente en nuestro medio. Podríamos mencionar los casos presentados en Oaxaca y Veracruz. La lesión se presenta como una pápula roja e indurada que rápidamente se hace más pequeña y superficial; en ocasiones la lesión puede presentar en el centro un color pardo o

negruzco que termina por abrirse en la superficie de la piel. Con la salida del parásito se origina, por consiguiente, la curación del paciente, y al mismo tiempo se logra hacer el diagnóstico etiológico del padecimiento (2-4).

d) **Mixta.** Esta variedad se puede desarrollar en pacientes que quizá están invadidos por más de una larva y, por lo tanto, presentan más de una forma cutánea (2-4).

Gnatostomiasis Ocular.

En México el primer caso de gnatostomiasis ocular fue descrito en 1970 por Peláez y Pérez Reyes en un paciente de Culiacán Sinaloa, en el que la larva fue extirpada del ojo izquierdo y se identificó como una larva de *Gnathostoma* de aspecto muy semejante a la larva de *G. Spinigerum*. A partir de esta fecha se han descrito más de 5 casos de gnatostomiasis ocular en la literatura nacional (6).

De acuerdo con una revisión realizada por Lamothe y cols, de los casos oculares que se han reportado en México, curiosamente, todos han presentado afección en el ojo izquierdo. Clínicamente se caracterizaron por dolor ocular intenso, disminución súbita de la agudeza visual, conjuntivitis, panuveitis, hemorragia en la cámara anterior e hipertensión ocular secundaria. A la exploración oftalmológica se detectó material mucoso, hiperemia conjuntival mixta, córnea edematosa con estrías en “descement” iris irregular, con algunas zonas de atrofia (5,6).

La sintomatología ocular depende del tiempo de evolución y localización de la larva, desde la disminución de la agudeza visual hasta el desprendimiento de la retina. El cuadro clínico se inicia generalmente con edema palpebral y celulitis orbitaria. Al penetrar en el globo ocular la larva ocasiona intenso dolor del globo ocular, en forma súbita se presenta disminución de la agudeza visual, edema localizado de la retina o área macular, hemorragia retiniana, iritis, uveitis, vitreitis, celulitis orbital. Posteriormente se presenta edema de la córnea (6).

Las larvas de *Gnathostoma* obtenidas mediante cirugía ocular se describen de color rojizo en la parte externa y en la interna de color oscuro, de forma cilíndrica y extremos redondeados, con una longitud de 2 mm y 0.225 mm de diámetro; en su extremo anterior presenta un bulbo cefálico espinoso con dos labios, cada uno con un par de papilas en medio de las cuales se abre la boca; el bulbo cefálico se encuentra separado del cuerpo por una ligera estrangulación y presenta cuatro hileras de ganchos quitinosos, cuyo número forma y disposición tienen importancia taxonómica. El cuerpo presenta numerosas hileras transversales de espinas cuticulares que se van haciendo cada vez más escasas conforme se acercan al extremo posterior (2,6).

El bulbo cefálico presenta en su interior dos pares de estructuras huecas llamadas ballonetitas que comunican cada una con un saco cervical, probablemente funcionan como un mecanismo hidráulico en los movimientos de expansión y retracción del bulbo (2,6,7).

La boca comunica con una faringe en forma de clava que ocupa el primer tercio del cuerpo, se continúa con el intestino y termina en el ano el que se encuentra situado en la parte ventral y subterminal del extremo posterior (2).

Gnatostomiasis cerebral

La gnatostomiasis en sistema nervioso central es una infección rara. Se presenta como un cuadro de meningitis eosinofílica y se caracteriza por cefalea intensa, pérdida transitoria de los reflejos osteotendinosos en miembros inferiores, paraplejía, retención de orina, con la alteración de los pares craneales con parálisis facial, dificultad para deglutir,

nistagmo, disartria, confusión mental, parálisis de las extremidades, pérdida repentina de la conciencia como consecuencia de hidrocefalia obstructiva transitoria o de hemorragia cerebral, coma y muerte. En la hemorragia subaracnoidea la mortalidad es de entre el 8 y el 25% (2-7).

En una serie de 24 pacientes estudiados por Boongird y cols, en Tailandia, encontraron entre otras alteraciones cefalea intensa, radiculomielitis, hemorragias subaracnoideas, radiculomieloencefalitis, alteración de pares craneales, deficiencias motoras y sensitivas de las extremidades, estado de coma. De los 24 pacientes 6 murieron. En México no se tienen reportes de esta localización (6).

Gnatostomiasis visceral

Durante su migración la larva L₃A puede afectar el aparato gastrointestinal. El paciente puede cursar asintomático y ser un hallazgo al realizar alguna cirugía por otra causa, o bien semejar un cuadro de apendicitis, obstrucción intestinal o carcinoma de colon. El cuadro clínico se manifiesta por la presencia de una tumoración dolorosa de crecimiento lento localizada al cuadrante inferior derecho, acompañada de dolor agudo en cuadrante inferior derecho. Al migrar la larva a través del hígado se presenta dolor abdominal en cuadrante superior derecho; por la cercanía de estructuras puede penetrar diafragma y ocasionar sintomatología pleuropulmonar con presencia de tos, disnea, hemoptisis, dolor pleurítico, consolidación lobar, derrame pleural o pneumotórax. Ocasionalmente la larva llega a ser expulsada con la expectoración resolviéndose el cuadro (2-4).

En el aparato genitourinario en la mujer se manifiesta con dolor urente suprapúbico, inflamación perineal, tumoración de los anexos, fiebre, sangrado transvaginal, cervicitis; en el hombre produce balanitis. Cuando se localiza en el tracto urinario se presenta hematuria. La larva puede expulsarse a través de la orina o bien por la vagina y presentarse la curación (2-4).

Gnatostomiasis oral

También se ha identificado a *Gnathostoma* en cavidad oral en encías, glándulas salivales y en dientes. Puede salir a través de la lengua. En la localización en oído se presenta disminución de la agudeza auditiva, tinitus, pudiéndose eliminar la larva a través del conducto auditivo externo (2-4).

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Se deberá hacer diagnóstico diferencial de la gnatostomiasis; se deberá hacer con Infecciones causadas por *Ancylostoma duodenale* o por *Necator americanus*, paragonimiasis, fasciolosis ectópica, o larva migrans visceral (toxocariasis visceral).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico definitivo se hace con la demostración de la larva L₃A de *Gnathostoma*, situación que no siempre puede realizarse, por lo que en el establecimiento del diagnóstico deben tenerse en cuenta los aspectos epidemiológicos son: la ingesta de carne de pescado crudo a mal cocido, el lugar de residencia del paciente principalmente si procede de áreas donde la gnatostomiasis es endémica, o haber viajado recientemente a esas zonas, así como el antecedente de haber presentado edema subcutáneo migratorio y eosinofilia en sangre periférica (2).

La serología es de utilidad en el diagnóstico de la Gnatostomiasis. Así, se han utilizado diferentes técnicas serológicas como la inmunofluorescencia indirecta, la hemaglutinación indirecta, el ELISA o la inmunoelectrotransferencia. Los antígenos

utilizado han sido extractos crudos de larvas L₃A de *G spinigerum* y adultos de *G. Dolore si*. Actualmente la prueba que más se utiliza es el ELISA utilizando antígenos de un extracto somático crudo y uno de excreciones y secreciones, que tiene una sensibilidad del 93% y una especificidad de 98.7%. En la prueba de inmunoblot realizada en paciente positivos se obtienen 2 bandas fuertes (30 y 38 kDa) y dos bandas débiles (35 y 43 kDa). La detección de IgE circulante es significativamente positiva al encontrarse bastante elevada. La biometría hemática reporta leucocitosis y eosinofilia de hasta el 31%, en el 50 al 70% de los pacientes (2,4,6).

Histológicamente se observa una paniculitis eosinofílica caracterizada por la presencia de infiltrados de mononucleares y eosinófilos. Se afectan los septos y el lobulillo sin producir necrosis (*Pani eosino*).

El líquido cefalorraquídeo se observa hemorrágico, xantocrómico, con aumento de las células de la serie blanca con predominio de linfocitos y un número variable de eosinófilos. Las proteínas se encuentran ligeramente elevadas, la glucosa se reporta normal (6).

TRATAMIENTO

Es importante mencionar que no existe tratamiento específico para esta helmintiasis. El más eficiente es la extirpación quirúrgica de la larva, procedimiento que no siempre es posible realizar. Con el tratamiento antiparásito es importante tener en cuenta que la recurrencia de la gnathostomiasis puede ser hasta de más de un año.

En relación con los medicamentos se han utilizado diferentes antiparasitarios como el albendazol que inicialmente fue probado en ratas y gatos infectados con L₃T, observándose muerte de la larva pero sólo en algunos casos. Con este antecedente Kraivichian y cols, realizaron un estudio antiparasitario en 112 pacientes que presentaban gnathostomiasis cutánea sintomática, con dos esquemas diferentes. Uno con albendazol a dosis de 400 mg por día durante 21 días, y el otro a igual dosis pero repartida en dos tomas durante el mismo período, los siguieron durante 6 meses al cabo de este periodo, los casos asintomáticos fueron considerados curados. La eficacia del tratamiento fue reportada entre el 93 y el 94% (8).

En México, en el estado de Sinaloa han sido tratados pacientes con albendazol a dosis de 10 mg/kg/día durante 20 días (dosis máxima 1000 mg), observando que las larvas emergen a planos superficiales de la piel entre los días 10 y 14 del postratamiento, con la formación de una lesión pseudofurunculosa en donde se puede realizar una escisión para extraer el parásito. En 20 pacientes que recibieron este tratamiento se realizaron biopsias cutáneas recuperándose sólo 7 larvas viables, en los 13 casos restantes se encontraron las larvas necrosadas. Con lo anterior se demuestra que al menos hasta los 14 días de tratamiento el antiparasitario no destruye el parásito (9,10).

Actualmente se está utilizando la ivermectina, medicamento que según reportes tiene una eficacia del 100% con una sola dosis de tratamiento (9,10).

La ivermectina administrada por vía oral se absorbe rápidamente, las concentraciones terapéuticas se alcanzan 4 horas después de su ingestión. Por vía tópica la absorción también es adecuada, su acción terapéutica se alcanza a las dos horas cuando se aplica sobre la piel intacta y en minutos en los casos de miasis cutánea. La ivermectina es excretada junto con la materia fecal en el más del 99% y sólo menos del 1% se excreta por vía renal (9-11).

Una dosis oral de 200 microgramos/kg (□g/kg) tiene una toxicidad insignificante. Los tratamientos repetidos han sido tolerados adecuadamente. A dosis de 10 mg/kg produce

ataxia, bradipnea, ptosis palpebral, disminución de la actividad corporal, temblores, náusea, vómito y midriasis (11).

Como efectos adversos se pueden observar la presencia de incremento del prurito en el sitio de la infestación, en filariasis produce fiebre, adenopatías y artralgias, alteraciones de las que no se ha determinado su origen, puesto que se ignora si su aparición se debe a la destrucción de los parásitos o a efectos secundarios del medicamento. En animales de experimentación la administración de una dosis hasta 10 veces mayor de la recomendada produce náusea, vómito, somnolencia, letargo, convulsiones, coma y muerte. En humanos no se ha presentado ninguna defunción atribuida a su administración (9-11).

En los microsomas hepáticos la ivermectina es metabolizada, con la formación de al menos 10 metabolitos, la mayoría son hidrolizados y demetilados. Se ha demostrado que el citocromo P4503A4 es el responsable del metabolismo de la ivermectina. Este citocromo es diferente del P450, citocromo que se le ha atribuido ser productor de la hepatotoxicidad.

Por la seguridad de que brinda la ivermectina se recomienda en pacientes con SIDA, inmunocomprometidos o sujetos a corticoterapia.

La ivermectina presenta un mecanismo de acción basado en la unión a los canales glutamados del calcio del ácido para amino butírico presente de las neuronas y tejido muscular de los invertebrados, al inhibir su función produce la muerte de los parásitos por asfixia e inanición. La ivermectina no tiene efectos sobre la acetilcolina, norepinefrina y serotonina del huésped, por lo que no interfiere su función (9-11).

La FDA en 1996 aprobó la ivermectina para uso humano en tabletas de 6 mg, indicada especialmente para la oncocercosis y la estrongiloidosis en niños mayores de 5 años de edad. Francia, en 2001, aprobó su uso en personas con escabiasis. Sin embargo, en algunos países en desarrollo aún no ha sido aprobada en parasitosis como pediculosis (capitis, corporis y pubis), escabiasis, miasis, larva migrans cutánea, tunguiasis, toxocariasis, gnatostomiasis y cisticercosis. Su uso está contraindicado en menores de 5 años, en mujeres embarazadas o en estado de lactancia (11-16).

En México, se ha usado la ivermectina a dosis de 200 microgramos/kg en niños con escabiasis y larva migrans cutánea. En ninguno se presentaron efectos secundarios (14).

En resumen, la ivermectina es un medicamento seguro, de fácil aplicación, eficaz y barato, con mínimos efectos secundarios que puede administrarse en niños a partir de un año de edad que presenten ecto y endoparasitosis (9-16).

REFERENCIAS

1. Cruz Aubry JE. "Zoonosis en la República Mexicana". *Rev Endocrinología y Nutrición*, vol. 4, pp. 206-208, 2002.
2. Díaz-Camacho SP, de la Cruz Otero MC, Willms MK. "Gnathostomosis". *Rev Fac Med UNAM*, vol. 5, pp. 192-201, 2000.
3. Ferrer-Bernat J. "Paniculitis eosinofílica migratoria subaguda". *Dermatología Rev Méx.*, vol. 1, pp. 19-23, 1991.
4. Martínez-Cruz JM, Bravo-Zamudio R, Aranda-Petrarca A, Martínez-Marañón R. "La Gnatostomiasis en México". *Salud Pública Méx.*, vol. 31, pp. 541-549, 1989.

5. Lamothe-Argumedo R. "La Gnatostomiasis en México: un problema de salud pública". *Anales del Instituto de Biología. U.N.A.M. Serie Zoología*, vol. 1, pp. 99-103, 2003.
6. Wong-Ortíz F, López JS, Ble-Castillo JL. "Gnatostomiasis ocular. Registro del primer caso para el estado de Tabasco", vol. 5, pp. 180-184, México, 2001.
7. Cruz-Reyes A, Botey MA. "Larva Migrans en México y su etiología por *Gnathostoma sp.*", *Mundo Médico*, vol. 28, pp. 11-22, 1997.
8. Kraivichian P., Kulkumthorn M., Yingyourd P., Akarabovorn P., Paireepai CC. "Albendazol for the treatment of human gnathostomiasis". *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, vol. 86, pp. 418-421, 1992.
9. Victoria J. "Usos clínicos de la ivermectina: estado actual de su uso en humanos". *Rev Col Dermatol.*, vol. 7, pp. 11-15, 1999.
10. Victoria J. "Ivermectina: nuevos usos de una vieja droga". *Rev Col Dermatol.*, vol. 7, pp. 29-32, 1999.
11. Del Mar Saez-De-Ocariz M, McKinster CD, Orozco-Covarrubias L, Tamayo-Sanchez L, Ruiz-Maldonado R. "Treatment of 18 Children with or Cutaneous Larvae Migrans Using Ivermectin". *Clin Exp Dermatol.*, vol. 27, pp. 264-7, 2002.
12. Elmogy M, Fayed H, Marzok H, Rashad A. "Oral Ivermectin in the Treatment of Scabies". *Int J Dermatol.*, vol. 38, pp. 926-930, 1999.
13. Huffam SE, Currie BI. "Ivermectin for *Sarcoptes Scabiei* Hyperinfestation". *Int J Dis.*, vol. 2, pp. 152-154, 1998.
14. Yeruham I, Hadani A. "Control of Human Scabies by Tropical Application of Ivermectin". *Ann Trop Med Parasitol.*, vol. 92, pp. 627-629, 1998.
15. Brooks PA, Grace RF. "Ivermectin is Better than Benzyl Benzoate for Childhood Scabies in Developing Countries". *J Paediatr Child Health*, vol. 38, pp. 401-4, 2002.
16. VictoriaJ, "Uso de ivermectina en niños". *Dermatol Pediatr Lat.*, vol. 1, pp. 61-65, 2003.

Una nueva visión de la degradación del almidón

Lilia Bernal
Investigadora. Escuela de Ciencias Químicas
Universidad La Salle.
E-mail: labg@ulsa.mx

Eleazar Martínez-Barajas
Departamento de Bioquímica
Facultad de Química(UNAM)

Recibido : Agosto de 2005. Aceptado: Octubre de 2005

RESUMEN

Todas las células vegetales sintetizan y degradan almidón en algún punto de su desarrollo; no obstante, existen notables diferencias con relación al destino del almidón producido. En las hojas se sintetiza y acumula durante el día mientras que en la noche se degrada. Esto permite proveer de carbono y mantener diferentes procesos celulares. La regulación de esta vía por lo tanto, deberá estar controlada de tal manera que quede integrada al metabolismo de la planta. La degradación del almidón es un proceso que depende de la estructura del gránulo, de la participación de diversas enzimas y su asociación con el gránulo. Estudios recientes muestran que la degradación del almidón en hojas es diferente a lo que sucede en endospermo y por lo tanto, es necesario construir un modelo particular para este sistema. Los estudios con mutantes y plantas transgénicas muestran que la β -amilasa es responsable de la hidrólisis de la mayor parte del almidón acumulado en hojas y la participación de la α -amilasa parece depender de la especie. Adicionalmente, en este trabajo se propone que las características del gránulo son muy importantes para definir la interacción con las proteínas que van a participar en su degradación.

Palabras clave: gránulo de almidón, degradación de almidón, amilosa, amilopectina, asociación proteína-gránulo de almidón.

ABSTRACT

All plant cells synthesize and degrade starch in determined stage of their development. There are, however, important differences related to its use. In leaves, starch is produced and accumulated at day while it is degraded at night to provide carbon maintaining cellular processes. This means that the pathway regulation is integrated to the whole plant metabolism. Starch degradation is a process that depends on the starch granule structure, the action of several enzymes and the association of these to the starch granule. Recent research reveals that starch degradation in leaves is significantly different from starch endosperm breakdown and these new data have led to build a particular model of this pathway. Studies with mutants and transgenic plants suggest that β -amylase has a major role in the hydrolysis of the accumulated starch in leaves, while the participation of α -amylase is probably species-dependent. Additionally, in this paper is suggested that starch granule characteristics are especially important in regulating the starch interaction between granule and proteins involved in starch metabolism.

Key words: starch granule, starch degradation, amylose, amylopectin, protein-starch granule association.

INTRODUCCIÓN

El almidón es un polímero de glucosa que constituye el principal producto de almacenamiento en semillas y otros órganos (43). Representa el 80% de la ingesta calórica mundial, se utiliza como alimento animal y es una importante materia prima para la industria (10). La importancia económica y social que adquirieron durante el siglo pasado las bebidas alcohólicas producidas a partir de cereales, llevó a una mayor investigación científica dirigida a conocer la naturaleza y regulación del proceso de degradación de almidón en el endospermo, el cual actualmente se entiende con profundidad tanto a nivel bioquímico como molecular (38). Sin embargo, la degradación del almidón en endospermo de cereales puede ser muy diferente a la forma en que este proceso ocurre en otras especies y órganos vegetales.

Todas las células vegetales sintetizan y degradan almidón en algún punto de su desarrollo; no obstante, existen notables diferencias con relación al destino del almidón producido. En órganos de almacenamiento como tubérculos, raíces y embriones puede acumularse por períodos muy largos, en meristemos y órganos en desarrollo la acumulación puede prolongarse por días o semanas, mientras que en las hojas se acumula durante el día y se degrada en la noche. En todos los casos la síntesis y degradación del almidón se llevan a cabo en los plastidios, pero ambos procesos en cada órgano, pueden regularse de manera muy diferente: mientras que el endospermo, al momento de la germinación, puede asemejarse a una bolsa repleta de almidón que recibe a las enzimas hidrolíticas, en las células de las hojas el almidón se degrada y provee de carbono para el mantenimiento de diferentes procesos dentro de la misma; por lo que esta vía debe estar perfectamente integrada a todo el metabolismo. La cantidad de almidón presente en un órgano representa un balance entre los procesos de síntesis y degradación. Si bien existen dudas acerca de algunos puntos críticos del proceso de síntesis, comparativamente se conoce menos acerca del proceso de degradación y de su regulación.

Actualmente se sabe que múltiples isoformas de las enzimas que degradan el almidón, como son α - y β -amilasas, enzimas desramificadoras, almidón fosforilasa, glucosidasas y enzima desproporcionadora están presentes en la mayoría de los órganos estudiados (44). En los últimos años los recursos genómicos disponibles para *Arabidopsis thaliana* y la posibilidad de generar mutantes y plantas transgénicas han contribuido a establecer el papel que cada una de esas enzimas tiene en el proceso.

El objetivo de este trabajo es abordar y discutir el tema de la degradación de almidón desde tres puntos de vista diferentes: el gránulo de almidón, las enzimas involucradas en el proceso y el papel de la interacción gránulo de almidón-enzimas hidrolíticas. Muchos aspectos de la degradación del almidón son comunes a todos los órganos en donde este proceso se ha estudiado; sin embargo, dada la importancia que tiene la degradación del almidón acumulado en las hojas para el desarrollo de las plantas, se buscará hacer énfasis en la regulación de ese proceso en particular.

EL GRÁNULO DE ALMIDÓN

El almidón es una mezcla de polímeros de glucosa (amilosa y amilopectina) que las plantas producen y acumulan en forma de gránulos insolubles que presentan formas y tamaños diversos. Los gránulos son estructuras altamente organizadas cuyas dimensiones y características varían entre especies, los gránulos de tubérculos de papa miden 100 μm (40), mientras que existen otros de 1-3 μm como los de raíz de taro o

los de hoja de *A. thaliana* (33, 51). Algunos gránulos tienen forma esférica o son esferoides aplanados con un surco ecuatorial, mientras que otros son poligonales (46).

La amilosa

Es un polímero lineal formado por cadenas de glucosas unidas por enlaces α -1,4, que constituyen el 20-30% del gránulo de almidón en los órganos de almacenamiento y 4-20% en los gránulos provenientes de las hojas (51, 11). Su peso molecular se encuentra en el orden de 10^5 - 10^6 (17). La localización exacta de la amilosa en el gránulo no ha sido determinada de manera concluyente, pero se ha sugerido que se encuentra principalmente en la región menos cristalina, la parte amorfa (15, 8). Se sabe que la amilosa se sintetiza por medio de la acción catalítica de la isoforma de almidón sintasa, que está unida al gránulo (GBSS), pues mutantes que carecen de GBSS en maíz (36), arroz (33, 45), trigo (24), papa, sorgo, amaranto, cebada y chícharo (17), sintetizan gránulos de almidón sin amilosa. Además, los estudios realizados en papa y arroz en los que se logró reducir la expresión de GBSS por medio de la expresión de RNA antisentido produjeron gránulos de almidón con contenido de amilosa considerablemente reducido. Estas mutantes en cereales se denominan “cerosas” debido a que dan como resultado endospermos opacos, los cuales son más susceptibles a la degradación, mientras que los almidones de papa y de maíz con alto contenido de amilosa son más resistentes (8).

No se sabe como la GBSS cataliza la síntesis de amilosa, ni que es lo que impide que las enzimas ramificadoras actúen para generar cadenas laterales, pues aunque la GBSS se encuentra siempre unida al gránulo, existen otras enzimas involucradas en el metabolismo del almidón que tienen capacidad de asociarse con él. Por ello no puede atribuirse la síntesis de amilosa al hecho de que las enzimas ramificadoras no se encuentren permanentemente asociadas al gránulo. Se ha especulado que probablemente la GBSS es la única enzima que mantiene su actividad asociada a los gránulos mientras que las enzimas ramificadoras no lo hacen, o que probablemente existen zonas en los gránulos donde la GBSS si tiene actividad mientras que las otras enzimas no (17).

Por otro lado, se han encontrado enzimas ramificadoras bacterianas que sí son capaces de actuar en regiones del gránulo de almidón donde las ramificadoras de plantas no lo hacen, generando un material ramificado considerado como un compuesto intermedio entre la amilosa y la amilopectina (16). Sin embargo, aún no se sabe cuales son las características de estas enzimas bacterianas que definen su capacidad para mantenerse activas en la región de la amilopectina. Otra de las preguntas aún sin resolver en la biosíntesis del almidón se relaciona con la generación, recambio e incorporación en los gránulos de almidón de los intermediarios que están entre ADP-glucosa y el almidón. Éstos se sintetizan *in vitro*, pero se han encontrado sólo escasamente *in vivo*, mientras que es imposible sintetizar almidón *in vitro*. En experimentos en donde, los gránulos de almidón se incubaron con ADP- ^{14}C glucosa se encontró que en períodos cortos (una hora) la marca era incorporada en la amilopectina [6], pero después de períodos largos (24 horas) la marca se encuentra principalmente en la amilosa. De estos resultados se concluyó que la GBSS primero extiende las cadenas de las moléculas de amilopectina y que a partir de estas, por hidrólisis, se obtengan cadenas que constituyen la amilosa (17). Existen varias posibilidades que podrían liberar las cadenas de amilosa; una de ellas es que las endoamilasas hidrolicen a la amilopectina y den lugar a cadenas de amilosa y otra que la GBSS tenga una segunda actividad mediante la cual las cadenas de glucanos se liberan después de una elongación progresiva. Dado que todas las mutantes que se han descrito como libres de amilosa presentan reducción de la actividad de GBSS, la última opción sería la más probable (17).

La amilopectina

La amilopectina es un polisacárido semicristalino, altamente ramificado, con un esqueleto de enlaces α -1,4 y 4-5% de puntos de ramificación α -1,6 (3). La amilopectina es una molécula de mayor tamaño que la amilosa y su peso molecular se encuentra entre 10^7 - 10^8 . El peso molecular y el grado de ramificación de la amilopectina varía ampliamente y esta variedad estructural contribuye a las diferencias en las propiedades químicas y físicas del almidón proveniente de diferentes fuentes (10). El análisis estructural de los gránulos muestra que las cadenas laterales de la amilopectina forman dobles hélices y están arregladas de tal manera que se forman paquetes que contienen entre 9 y 17 cadenas laterales en intervalos regulares de aproximadamente 9-10 nm de largo sobre el eje de la molécula y dan lugar a las lamelas cristalinicas, que se encuentran alternadas con lamelas amorfas formadas por las regiones donde se localizan los puntos de ramificación y por los espacios entre los agregados de dobles hélices (figura 1) (8). El modelo de "empaquetamiento" (figura 2), considera que la amilopectina se constituye de diferentes tipos de cadenas y esto se apoya por las observaciones de tres diferentes clases de cadenas, A, B, y C, que varían en longitud y que se asocian para formar los paquetes.

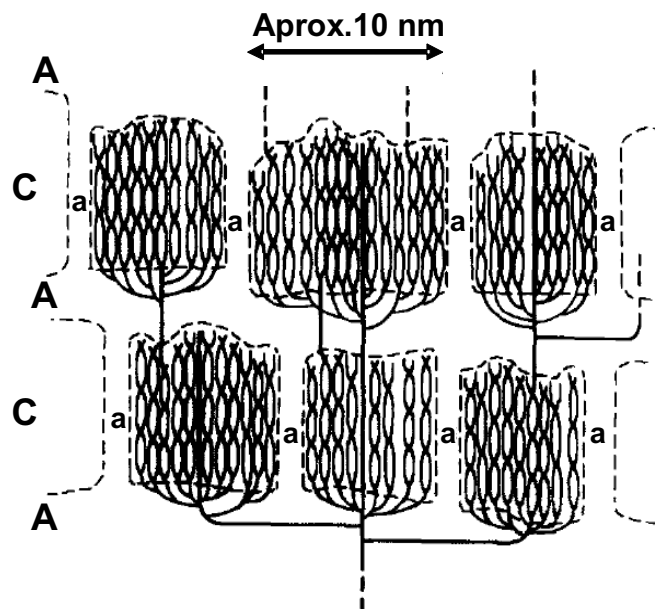


Figura 1. Esquema del empaquetamiento de las cadenas laterales de amilopectina en las lamelas. Cada empaquetamiento contiene entre 9 y 17 cadenas laterales. Las zonas amorfas se localizan entre las lamelas cristalinicas y entre cada paquete de cadenas laterales. A, lamelas amorfas (zona de ramificación) de aproximadamente 4nm de largo; C, lamelas cristalinicas (paquetes de cadenas laterales de amilopectina) de 6 nm de largo en promedio; a, regiones amorfas entre los paquetes cristalinicos. Tomado de Gallant, 1997.

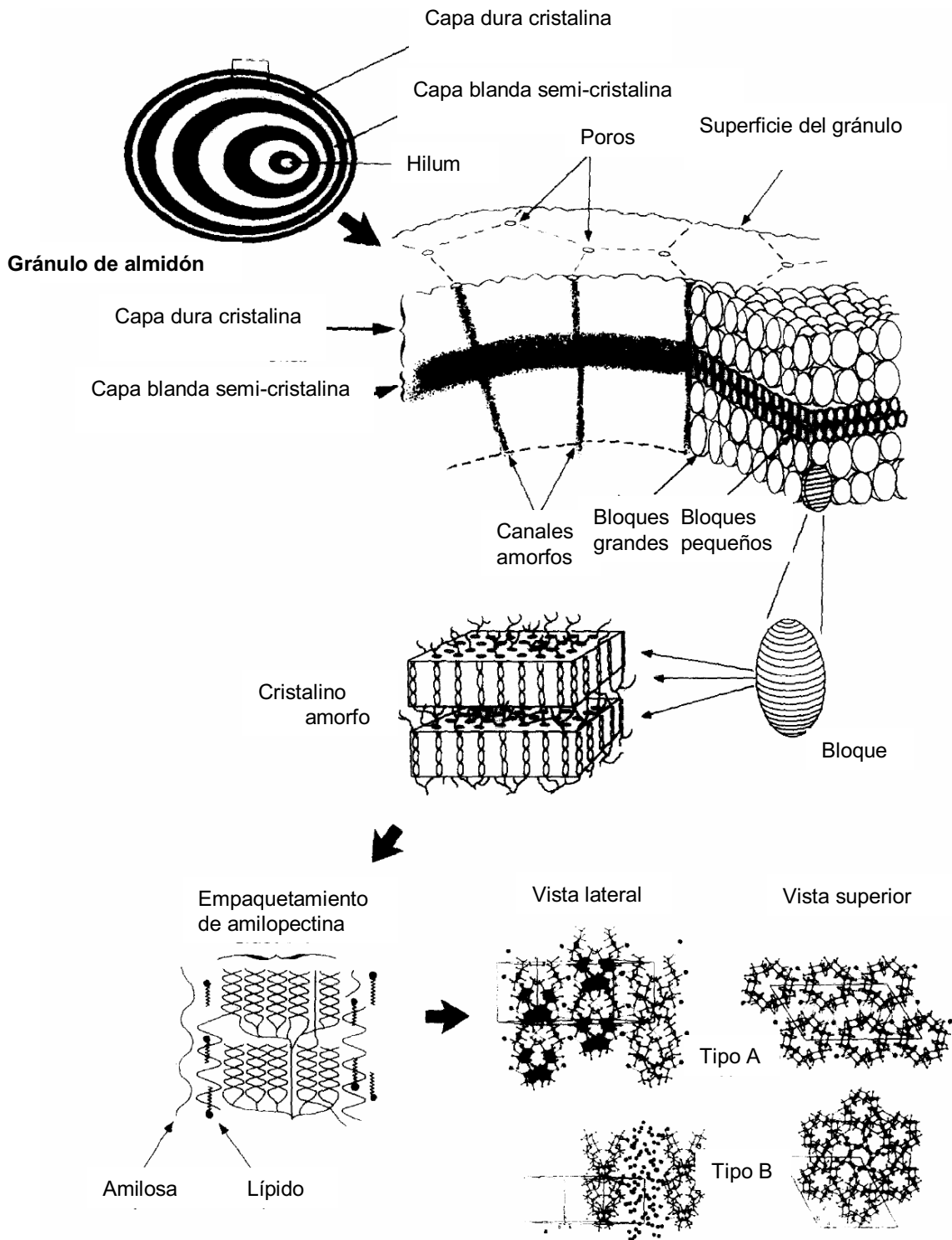


Figura 2. Estructura del gránulo de almidón
Tomado de Gallant, 1997

Los patrones de difracción de rayos X que se obtienen de almidones de diferentes plantas se pueden agrupar en dos tipos principales. El tipo A es característico del almidón de cereales y se distingue por el denso empaquetamiento de las dobles hélices y el tipo B, en el que las dobles hélices están arregladas de tal manera que permiten que moléculas de agua queden incluidas en el arreglo. En algunos almidones principalmente del tipo A, se ha observado la presencia de canales amorfos o poros que podrían estar relacionados con la mayor o menor susceptibilidad del almidón a la degradación enzimática, pues los almidones cuyos gránulos presentan estas estructuras tienden a ser más fácilmente degradados (17). La variación en la susceptibilidad a la degradación de los gránulos de almidón también depende del origen botánico, lo cual evidencia algunas diferencias estructurales (90). Durante la α -amilolisis del almidón, las regiones menos cristalinas, son más fácilmente degradadas que las regiones cristalinas (8). Se ha sugerido que la velocidad de hidrólisis del almidón depende, en gran medida, de la distribución de las zonas cristalina y semi-cristalina, así como del tamaño e interacción de sus componentes.

La amilopectina se sintetiza predominantemente en la superficie del gránulo y participan por lo menos nueve isoformas de enzimas, entre las que se encuentran la enzima almidón sintasa (SS) y las enzimas ramificadoras. Se han identificado numerosas isoformas de SS en plantas (10) y se conoce poco con relación a su función y especificidad. Para entender la función de la enzima SS en la biosíntesis de almidón es necesario también conocer cuál es su interacción con las enzimas desramificadoras pues múltiples isoformas actúan de manera concertada para sintetizar la amilopectina y determinar su estructura (17).

Otros componentes del gránulo

Además del peso molecular, la amilosa y la amilopectina presentan diferencias en la capacidad para asociarse con otras moléculas. La naturaleza química de la amilosa provoca que forme asociaciones con pequeñas moléculas hidrófobas, por lo que es común que a la fracción de amilosa se encuentre asociada una proporción alta de lípidos (23), mientras que la amilopectina contiene grupos fosfatos unidos de manera covalente. El nivel de fosforilación varía con el origen botánico del almidón, encontrándose que el almidón que proviene de cereales presenta niveles de fosforilación apenas perceptibles (<0.01%), mientras que el almidón de papa está altamente fosforilado (0.5%) (21). En las hojas el almidón transitorio presenta aproximadamente 0.1% de residuos de glucosas fosforiladas (49). Los grupos fosfato están unidos como monoésteres en las posiciones C-3 y C-6 de las unidades de glucosa y esta fosforilación parece que ocurre tanto durante la síntesis como durante la degradación del almidón (25, 28). La fosforilación en la posición C-3 principalmente, puede modificar el empaquetamiento de las dobles hélices (3) y esto de alguna manera puede alterar el ordenamiento del gránulo y cambiar la interacción con las proteínas que se asocian con el almidón para llevar a cabo su degradación, pues se tienen evidencias de que si se disminuye el grado de fosforilación también la degradación se ve disminuida (2, 49, 52).

ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA DEGRADACIÓN DEL ALMIDÓN

Durante el día las células de las hojas toman carbono que se convierte a partir de la fotosíntesis en sacarosa y almidón. La sacarosa se exporta a los tejidos no fotosintéticos y el almidón se almacena en el cloroplasto. En la noche este almidón se degrada para proveer a la célula y a otros órganos de carbono, energía y poder reductor. El suministro de carbono a partir del almidón degradado en la noche es esencial para el desarrollo de la planta.

La degradación del almidón involucra la asociación temporal de los gránulos con muchas enzimas (30). El primer paso en este proceso debe ser catalizado por una enzima capaz de actuar en la superficie semicristalina del gránulo. Aunque existen varias enzimas capaces de degradar los gránulos de almidón *in vitro* la única enzima que se ha encontrado que puede hacerlo *in planta* es la α -amilasa (1); esta endoenzima hidroliza los enlaces glicosídicos α -1,4 en polímeros de glucanos (47). En el genoma de *Arabidopsis*, existen tres genes que pueden codificar tres isoformas de α -amilasa, una de las cuales (AMY3) se encuentra en el cloroplasto (tabla 1) (19); sin embargo, Yu, *et al.* [48] mostraron que en ausencia de AMY3 la degradación del almidón ocurre de manera normal. Esto sugiere que el ataque inicial en la superficie de los gránulos no requiere una endoamilasa, o que *A. thaliana* posee otra endoamilasa cuya secuencia de aminoácidos es muy diferente, por lo que no ha sido identificada como tal. Mientras que Asatsuma *et al.* (1) encontraron evidencias de la participación de la isoforma I-1 de α -amilasa en la degradación de almidón de hoja en arroz. Por lo que aún cabe la duda de si es la α -amilasa la enzima responsable de iniciar la degradación del gránulo de almidón y si este evento depende de la especie.

Tabla 1. Enzimas que se sabe actúan ó podrían actuar en *Arabidopsis* sobre enlaces glicosídicos α -1,4 ó α -1,6.

Enzima	Gen	Localización en plastidios (predicha) ^a
α -Amilasa 1	AMY1	No
α -Amilasa 2	AMY2	No
α -Amilasa 3	AMY3	Sí
β -Amilasa 1	BAM 1	Sí
β -Amilasa 2	BAM2	Sí
β -Amilasa 3	BAM3	Sí
β -Amilasa 4	BAM4	No
β -Amilasa 5	BAM5	No
β -Amilasa 6	BAM6	No
β -Amilasa 7	BAM7	No
β -Amilasa 8	BAM8	No
β -Amilasa 9	BAM9	No
Glucan agua dicinasa	GWD1	Dudoso
Fosfogluca agua dicinasa	PWD	Sí
Almidón fosforilasa cloroplástica	PHS1	Sí
Almidón fosforilasa citosólica	PHS2	No
Enzima desproporcionadora	DPE1	Sí
Transglucosidasa	DPE2	Sí
Isoamilasa 1	ISA1	Dudoso
Isoamilasa 2	ISA2	Sí
Isoamilasa 3	ISA3	Sí
Pululanasa	LDA1	Sí
α -glucosidasa		

Modificada de Lloyd J, 2005.

^aLa predicción se hizo mediante los programas TargetP (Emanuelsson, 2000) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) y Predatar (<http://www.inra.fr/predotar/>). El

término dudoso se aplicó cuando los resultados en ambos programas eran contradictorios.

Por otro lado, independientemente de cuál es la enzima que inicie el ataque, actualmente se sabe que la enzima glucan, agua dicinasa (GWD) es necesaria en el proceso de degradación de almidón (4, 49, 52). En papa, se mostró que la enzima GWD transfiere el β -fosfato del ATP a los carbonos 3 o 6 de los glicosilos que forman la amilopectina (22, 29) y aparentemente esta fosforilación *in vivo* ocurre tanto durante el período de síntesis como en el período de degradación (25, 28). La función de la proteína GWD en la degradación se podría explicar con base en que los grupos fosfato influyen en el empaquetamiento del gránulo y, de esta manera, modifican la susceptibilidad de la superficie al ataque enzimático; o bien, que la proteína, a través del dominio que está en el extremo N-terminal y cuya función es hasta ahora desconocida, promueva la actividad de alguna enzima ya sea interaccionando con la superficie del gránulo o bien con la misma proteína (37). El descubrimiento de que una segunda dicinasa (PWD, fosfoglucon, agua dicinasa), se requiere en la degradación del almidón ha incrementado la complejidad de este proceso. Se ha sugerido que GWD actúa junto con PWD generando un patrón de fosforilación de la amilopectina en la superficie del gránulo que lo hace accesible al ataque enzimático, sin embargo, la información al respecto es incompleta (18).

Una vez iniciada la degradación del gránulo del almidón, se generarán glucanos solubles en el estroma del cloroplasto, que pueden metabolizarse a través de fosforólisis por la enzima glucan fosforilasa cloroplástica, generándose glucosa 1-fosfato (53) o por la enzima β -amilasa que cataliza la producción de β -maltosa a partir del extremo no reductor de α -1,4-glucanos. Los estudios que se han realizado indican que la β -amilasa es responsable de la hidrólisis de la mayor parte del almidón acumulado en hojas de papa (35) y en cloroplastos de *A. thaliana* (50) y que la maltosa producida se exporta al citosol por medio de un transportador específico (26).

Las enzimas α -amilasa y β -amilasa hidrolizan los enlaces α -1,4, pero no los α -1,6; esto significa que existen otras enzimas para romper los enlaces que dan lugar a las ramificaciones, mismas que se han nombrado enzimas desramificadoras, que pueden dividirse en isoamilasas o dextrinasas límite, dependiendo de su especificidad por el sustrato. El genoma de *A. thaliana* contiene cuatro genes de enzimas desramificadoras, tres isoamilasas (ISA1, ISA2 e ISA3; tabla1) y una dextrinasa límite. Sin embargo, aparentemente esta última no está involucrada en la degradación de almidón en hojas de *A. thaliana*, pues existe una mutante *knockout* sin actividad de dextrinasa límite que no mostró cambio en su velocidad de degradación del almidón (37). El papel de las isoamilasas no es claro, pues se ha visto que también están involucradas en la síntesis de almidón. En hojas de *A. thaliana*, tubérculos de papa y endospermo de cereales existe evidencia que al reducir o suprimir la actividad de estas enzimas se altera la síntesis de almidón, incrementándose el número de gránulos, reduciéndose su tamaño y promoviendo la síntesis de fitoglucógeno, un polímero soluble de glucosas con enlaces α -1,4 y α -1,6 (37, 19). Aunque ISA1 e ISA2 son necesarias en la síntesis de almidón en hojas de *A. thaliana*, estas enzimas no parecen ser necesarias en la degradación de almidón durante la noche, pues las mutantes *isa1* e *isa2* (*dbe1*) presentan una degradación total del almidón y del fitoglucógeno (19, 37).

Dado que ni la dextrinasa límite ni las enzimas ISA1 e ISA2 parecen participar en la degradación del almidón en hojas, podría sugerirse que la hidrólisis de los puntos de ramificación del almidón se cataliza por ISA3, sin embargo, no existen mutantes en las que se haya reprimido la actividad de esta enzima que pongan de manifiesto la importancia de su participación, pero estudios recientes en los que se utilizaron microarreglos, mostraron que el patrón de expresión de ISA3 es similar al de otras enzimas involucradas en la degradación del almidón (39). No obstante, debe

considerarse la posibilidad de que estén involucradas otras enzimas todavía no identificadas.

Otro grupo de enzimas que también participan en la degradación del almidón son las enzimas desproporcionadoras o enzimas D. La enzima β -amilasa es incapaz de actuar sobre cadenas de menos de cuatro glucosas por lo que genera maltotriosas que serán sustrato de estas enzimas. La enzima D transfiere dos de los glucosilos de la maltotriosa a una cadena mayor de glucanos, permitiendo de esta manera que la molécula generada esté disponible para la hidrólisis de β -amilasa y la glucosa restante puede exportarse al citosol, a través del transportador de glucosa localizado en la membrana interna (43). Además de la isoforma plastídica de la enzima D, existe una isoforma citosólica llamada DPE2. Los estudios en una mutante de DPE2 sugieren que esta enzima utiliza la maltosa liberada por el cloroplasto (5). La maltosa producida por la enzima β -amilasa podría ser hidrolizada a glucosa a través de una α -glucosidasa y después por medio de una hexocinasa convertida en glucosa 6-fosfato, sin embargo, parece ser que se metaboliza a través de una reacción de transglucosilación con la enzima DP2, transfiriendo una de las glucosas de la maltosa a un poliglucano ramificado y liberando una glucosa que la hexocinasa puede transformar en hexosa fosfato (37). El esquema que describe la acción de las enzimas involucradas en la degradación de los gránulos de almidón se presenta en la figura 3.

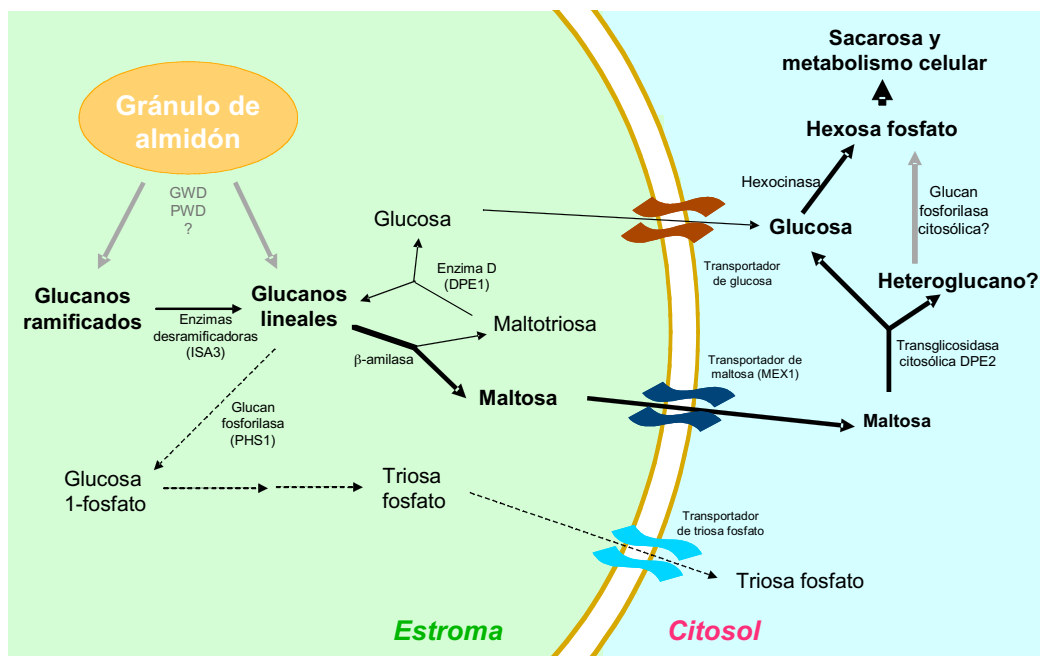


Figura 3. Vía propuesta para la degradación del almidón de hojas en *Arabidopsis*. Tomado de Smith 2005.

LA INTERACCIÓN GRÁNULO DE ALMIDÓN-ENZIMA

Las plantas acumulan almidón en sus hojas durante el día como una fuente de energía para la noche siguiente, lo que sugiere que debe existir un proceso altamente regulado. Como se mencionó anteriormente, aún no se sabe con exactitud que enzima inicia la degradación del almidón; sin embargo, es razonable asumir que las reacciones involucradas tendrán lugar en la interfase del gránulo de almidón y el estroma. Por ello,

la asociación de diferentes proteínas a la superficie del gránulo constituirá un paso esencial en el metabolismo de degradación del almidón (30). Los factores que definen la interacción proteína-almidón aún se encuentran en estudio; no obstante, se sabe que la asociación de algunas proteínas depende del estado metabólico de la célula como es el determinado por los períodos de luz-oscuridad.

En el caso de la proteína GWD (anteriormente llamada R1) se ha mostrado que su asociación a los gránulos de almidón es reversible y que la asociación es una interacción proteína-carbohidrato, que no involucra a otras proteínas, al menos *in vitro* (30). En hojas de *A. thaliana*, papa, chícharo y frijol, aparentemente la cantidad de la proteína GWD permanece constante (30, 49); sin embargo, para las últimas tres especies se ha mostrado que la proporción de proteína GWD asociada al gránulo se incrementa considerablemente durante el período de degradación (2, 28). Los estudios anteriores muestran que existe una coincidencia entre la unión de GWD y el grado de fosforilación, pero no se han definido aún las modificaciones que ocurren en la superficie del gránulo durante su degradación que llevan a una mayor asociación de proteínas e incrementan su actividad. Existen evidencias que muestran que en condiciones *in vitro*, los gránulos de almidón con mayor grado de fosforilación son mejores sustratos para la proteína GWD y además son más susceptibles a la degradación amilolítica (2, 28), lo que podría estar sugiriendo que la fosforilación de la superficie del gránulo facilita también la asociación de otras enzimas y que características del gránulo como el nivel de fosfato son relevantes en este proceso.

También se ha reportado que la proporción de amilosa y amilopectina, así como el largo de las cadenas de amilopectina, contribuyen en la degradación del almidón. Los almidones que presentan altos contenidos de amilosa tienen mayor resistencia a la degradación enzimática que los almidones con niveles bajo (8), no se conoce cuál es la razón de esta relación pero cabría la posibilidad de que dado que la proporción de amilopectina en estos gránulos es menor, entonces la capacidad de fosforilación que sólo se da en esta fracción, también será menor y en consecuencia la asociación de proteínas se verá reducida. Por otro lado, existen evidencias de que la actividad de la proteína GWD se ve favorecida por cadenas largas de amilopectina (DP 30-100) (22); sin embargo, en los estudios reportados por Ritte *et al.* (28) no se observaron cambios relevantes durante el ciclo luz-oscuridad en el largo de la cadena de las moléculas periféricas de amilopectina, lo que sugiere que aparentemente este factor no contribuye a la mayor interacción proteína-almidón.

Además, se sabe que varias de las proteínas que están involucradas en el metabolismo de almidón poseen módulos de unión a almidón diferentes del dominio catalítico (32). Una de las funciones de estos dominios es unir a la enzima a la superficie insoluble del gránulo de almidón y existen evidencias de que la actividad de estas enzimas sobre sustratos insolubles se pierde si el dominio se remueve, mientras que su actividad hacia sustratos solubles se mantiene (14). Se ha sugerido que estos dominios también modifican la superficie del gránulo (41), lo que probablemente permitiría la unión al almidón de otras proteínas que no poseen estos dominios pero que están involucradas en la degradación del almidón. Se ha reportado la presencia de estos dominios en α -amilasa, β -amilasa y pululanasa de microorganismos y plantas como maíz y cebada (13, 31, 32, 42).

CONCLUSIONES

El avance en el conocimiento del genoma de *A. thaliana* ha permitido lograr un mayor entendimiento del proceso de degradación del almidón acumulado en las hojas y hace posible proponer un modelo como el de la figura 3. Sin embargo, no se puede generalizar ni a otros órganos ni a otras especies. Aún no se sabe quién inicia la degradación del gránulo de almidón ni se conoce con exactitud como se da la asociación

de las proteínas con el gránulo por lo que se requieren otras investigaciones que permitan conocer la relación entre la fosforilación y la asociación de las proteínas con el gránulo. Por otro lado, es poco lo que se conoce acerca de la regulación de este proceso y aunque recientemente se han mostrado evidencias de que la actividad de las enzimas biosintéticas se controla post-traduccionalmente (regulación REDOX y fosforilación) y se ha propuesto que el proceso de degradación requiere activación post-traducciona l y/o la formación de complejos proteicos, aún se está lejos de poder entender cómo se controla el flujo a través de esta vía.

RECONOCIMIENTOS

Se agradece el apoyo de Jimena Rojas Bernal y Javier Andrés Juárez Díaz en la revisión de este documento y el financiamiento otorgado por CONACYT (beca), Facultad de Química UNAM (PAIP 6290-14), DGAPA IN201502 y ULSA Q063/2004.

REFERENCIAS

1. Asatsuma S., Sawada C., Itoh K., Okito M., Kitajima A. "Involvement of α -Amylase I-1 in Starch Degradation in Rice Chloroplasts". *Plant Cell Physiol.*, vol. 46, pp. 858-869, 2005.
2. Bernal, L., Coello, P., Martínez-Barajas E. "Possible Role Played by R1 Protein on Starch Accumulation in Bean Seedlings (*Phaseolus Vulgaris*) under Phosphate Deficiency". *J. Plant Physiol.*, vol. 162, pp. 970-976, 2005.
3. Blennow A, Engelsen SB, Nielsen TH, Baunsgaard L, Mikkelsen R. "Starch Phosphorylation: New Front Line in Starch Research". *Trends Plant Sci.*, vol. 7, núm. 10, pp. 445-450, 2002.
4. Caspar T, Lin TP, Kakefuda G, Benbow L, Preiss J, Somerville C. "Mutants of Arabidopsis with Altered Regulation of Starch Degradation". *Plant Physiol.*, vol. 95, pp. 1181-1188, 1991.
5. Chia T., Thorneycroft D., Chapple A., Messerli G., Chen J. "A Cytosolic Glucosyl-Transferase is Required for Conversion of Starch to Sucrose in *Arabidopsis* Leaves at Night". *Plant J.*, vol. 37, pp. 853-863, 2004.
6. Denyer K, Clark B, Hilton C, Tatge H, Smith A. "The Elongation of Amylose and Amylopectin Chains in Isolated Starch Granules". *Plant J.*, vol. 10, pp. 1135-1143, 1996.
7. Emanuelsson O. *et al.* "Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence". *J. Mol. Biol.*, vol. 300, pp. 1005-1016, 2000.
8. Gallant, D., Bouchet, B., Baldwin P. "Microscopy of Starch: Evidence of a New Level of Granule Organization". *Carbohydrate Polymers*, vol. 32, pp. 177-191. 1997.
9. Gallant, D., Bouchet, B., Buléon A, Perez S. "Physical Characteristics of Starch Granules and Susceptibility to Enzymatic Degradation". *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 46, pp. S3-S16, 1992.
10. Guan, HP y Keeling, PL. "Starch Biosynthesis: Understanding the Functions and Interactions of Multiple Isozymes of Starch Synthase and Branching Enzyme". *Trends in Glycosci and Glycotechnol*, vol. 10, pp. 307-319, 1998.

11. Hovenkamp-Hermelink J, De Vries J, Adamse P, Jacobsen E, Witholt B, Feenstra J. "Rapid Estimation of the Amylose/Amylopectin Ratio in Small Amounts of Tuber and Leaf Tissue of the Potato". *Potato Res.*, vol. 31, pp. 241-246, 1988.
12. Huber KC y BeMiller, JN. "Visualization of Channels and Cavities of Corn and Sorghum Starch Granules". *Cereal Chem.*, vol. 74, pp. 537-545, 1997.
13. Janecek S y Sevcik J. "The Evolution of Starch Binding Domain". *FEBS Lett.*, vol. 456, pp. 119-125, 1999.
14. Ji Q, Vincken J, Suurs L, Visser R. "Microbial Starch Binding Domain as a Tool for Targeting Proteins to Granules During Starch Biosynthesis". *Plant Mol. Biol.*, vol. 51, pp. 789-801, 2003.
15. Jobling, S. "Improving Starch for Food and Industrial Applications". *Curr. Opinion Plant Biol.*, vol. 7, pp. 210-218, 2004.
16. Kortstee A, Vermeesch A, de Vries B, Jacobsen E, Visser R. "The Influence of an Increased Degree of Branching on the Physico-Chemical Properties of Starch from Genetically Modified Potato". *Carbohydr. Polymers*, vol. 37, pp. 173-184, 1998.
17. Kossmann J y Lloyd J. "Understanding and Influencing Starch Biochemistry". *Crit Rev Plant Sci.*, vol. 19, pp. 171-226, 2000.
18. Kotting O, Pusch K, Tiessen A, Geigenberger P, Steup M, Ritte G. "Identification of a Novel Enzyme Required for Starch Metabolism in Arabidopsis Leaves. The Phosphoglucan, Water Dikinase". *Plant Physiol.*, vol. 137, pp. 242-252, 2005.
19. Lloyd J, Kossmann J, Ritte G. "Leaf Starch Degradation Comes out of the Shadows". *Trends Plant Sci.*, vol. 10, pp. 130-137, 2005
20. Lloyd JR, Springer F, Buléon A, Muller-Röber B, Willmitzer L, Kossmann J. "The Influence of Alteration in ADP-Glucose Pyrophosphorylase Activities on Starch Structure and Composition in Potato Tubers", *Planta*, vol. 209, pp. 230-238, 1999.
21. Mikkelsen R y Blennow A. "Functional Domain Organization of the Potato α -glucan, Water Dikinase (GWD): Evidence for Separate Site Catalysis as Revealed by Limited Proteolysis and Deletion Mutants". *Biochem. J.*, vol. 385, pp. 355-361, 2005.
22. Mikkelsen R y Blennow A. "Functional Characterization of α -glucan, Water Dikinase, the Starch Phosphorylating Enzyme". *Biochem J.*, vol. 377, pp. 525-532, 2004.
23. Morrison W. "Starch Lipids and How They Relate to Starch Granule Structure and Functionality". *Cer. Foods World*, vol. 40, pp. 437-446, 1995.
24. Nakamura T, Yamamori M, Hirano H, Hidaka S, Nagamine T. "Production of Waxy (Amylose-Free) Wheats". *Mol. Gen. Genet.*, vol. 248, pp. 253-259, 1995.

25. Nielsen TH, Wischmann B, Enevoldsen K, Moller BL. "Starch Phosphorylation in Potato Tubers Proceeds Concurrently with *de Novo* Biosynthesis of Starch". *Plant Physiol.*, vol. 105, pp. 111-117, 1994.
26. Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman. "A Previously Unknown Maltose Transporter Essential for Starch Degradation in Leaves". *Science*, vol. 303, pp. 87-89, 2004.
27. Reimann R, Ritte G, Steup M, Appenroth KJ. "Association of α -amylase and the R1 Protein with Starch Granules Precede the Initiation of Net Starch Degradation in Turions of *Spirodela polyrhiza*". *Physiol Plant.*, vol. 114, pp. 2-12, 2002.
28. Ritte G, Scharf A, Eckermann N, Häbel S, Steup M. "Phosphorylation of Transitory Starch is Increased During Degradation". *Plant Physiol.*, vol. 135, pp. 2068-2077, 2004.
29. Ritte G, Lloyd JR, Eckermann N, Rottmann A, Kossmann J, Steup M. "The Starch-Related R1 Protein is an α -glucan, Water Dikinase". *PNAS*, vol. 99, núm. 10, pp. 7166-7171, 2002.
30. Ritte G, Loberth R, Steup M. "Reversible Binding of the Starch-Related R1 Protein to the Surface of Transitory Starch Granules". *Plant J.*, vol. 21, núm. 4, pp. 387-391, 2000.
31. Robert X, Haser R, Gottschalk T, Ratajczak F, Driguez H, Svensson B, Aghajari N. "The Structure of Barley α -amylase Isozyme 1 Reveals a Novel Role of Domain C in Substrate Recognition and Binding: A Pair of Sugar Tongs". *Structure*, vol. 11, pp. 973-984, 2003.
32. Rodríguez-Sanoja R, Oviedo N Sanchez S. "Microbial Starch-Binding Domain". *Curr. Opinion in Microb.*, vol. 8, pp. 260-267, 2005.
33. Sano Y. "Differential Regulation of *Waxy* Gene Expression in Rice Endosperm". *Theor. Appl. Genet.*, vol. 68, pp. 467-473, 1984.
34. Santacruz S, Koch K, Andersson R, Aman P. "Characterization of Potato Leaf Starch". *J Agric Food Chem.*, vol. 52, pp. 1985-1989, 2004.
35. Scheidig A, Frölich A, Schulze S, Lloyd JR, Kossmann J. "Downregulation a Chloroplast-Targeted β -amylase Leads to Starch-Excess Phenotype in Leaves". *Plant J.*, vol. 30, núm. 5, pp. 581-591, 2002.
36. Shure M, Wessler S, Fedoroff N. "Molecular Identification and Isolation of the *Waxy* Locus in Maize". *Cell.*, vol. 35, pp. 225-233, 1983.
37. Smith AM, Zeeman SC, Smith SM. "Starch Degradation". *Annu Rev Plant Biol.*, vol. 56, pp. 73-98, 2005.
38. Smith AM, Zeeman SC, Thorneycroft D, Smith SM. "Starch Mobilization in Leaves". *J Exp Bot.*, vol. 54, pp. 577-583, 2003.
39. Smith A., Fulton D., Chia T., Thorneycroft D., Chapple A. "Diurnal Changes in the Transcriptome Encoding Enzymes of Starch Metabolism Provide Evidence for both Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation". *Plant Physiol.*, vol. 135, pp. 2687-2699, 2004.

40. Smith AM. "The Biosynthesis of Starch Granules". *Biomacromolecules*, vol. 2, pp. 335-341, 2001.
41. Southall, S.M., Simpson, P.J., Gilbert, H.J., Williamson, G., Williamson, M.P. "The Starch Binding Domain from Glucoamylase Disrupts the Structure of Starch". *FEBS Lett.*, vol. 447, pp. 58-60, 1996.
42. Svensson B, Jespersen H, Sierks M, MacGregor E. "Sequence Homology Between Putative Raw-Starch Binding Domains from Different Starch Degrading Enzymes". *Biochem. J.*, vol. 264, pp. 309-311, 1989.
43. Tetlow IJ, Morell MK, Emes J. "Recent Developments in Understanding the Regulation of Starch Metabolism in Higher Plants". *J Exp Bot.*, vol. 55, pp. 2135-2145, 2004.
44. Trethewey R y Smith A. "Starch Metabolism in Leaves". En RC Leegood, TD Sharkey, S von Caemmerer, eds, *Advances in Photosynthesis*, vol. 9, *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 205–231, 2000.
45. Villareal C y Juliano B. "Waxy Gene Factor and Residual Protein of Rice Starch Granule". *Starch/Staerke*, vol. 38, pp. 118-119, 1986.
46. Wang L, Wang Y, Porter R. "Structures and Physicochemical Properties of Six Wild Rice Starches". *J Agric Food Chem.*, vol. 50, pp. 2695-2699, 2002.
47. Whitaker JR. "Principles of Enzymology for the Food Sciences". Marcel Dekker Inc. U.S.A., pp 400-412, 1994.
48. Yu T, Zeeman SC, Thorneycroft D, Fulton DC, Dunstan H, Lue W, Hegemann B, Tung S, Umemoto T, Chapple A, Tsai D, Wang S, Smith AM, Chen J, Smith SM. "α-amylase is not Required for Breakdown of Transitory Starch in *Arabidopsis* Leaves". *J. Biol. Chem.*, vol. 280, pp. 9773-9779, 2005
49. Yu TS, Kofler H, Häusler RE, Hille D, Flügge U, Zeeman SC, Smith AM, Kossmann J, Lloyd J, Ritte G, Steup M, Lue WL, Chen J, Weber A. "The *Arabidopsis* *Sex1* Mutant Defective in the R1 Protein, a General Regulator of Starch Degradation in Plants, and not in the Chloroplast Hexose Transporter". *Plant Cell.*, vol. 13, pp. 1907-1918, 2001.
50. Zeeman SC, Thorneycroft D, Schupp N, Chapple A, Weck M, Dunstan H, Haldimann P, Bechtold N, Smith AM, Smith SM. "Plastidial α-glucan Phosphorylase is not Required for Starch Degradation in *Arabidopsis* Leaves but Has a Role in the Tolerance of Abiotic Stress". *Plant Physiol.*, vol. 135, pp. 849-858, 2004.
51. Zeeman SC, Tiessen A, Pilling E, Kato KL, Donald AM, Smith A. "Starch Synthesis in *Arabidopsis*. Granule Synthesis, Composition and Structure". *Plant Physiol.*, vol. 129, pp. 516-529, 2002.
52. Zeeman SC, ap Rees T. "Changes in carbohydrate metabolism and assimilate export in starch-excess mutants of *Arabidopsis*". *Plant Cell Env.*, vol. 22, pp. 1445-1453, 1999.
53. Zeeman SC, Northrop F, Smith AM, ap Rees T. "A Starch-Accumulating Mutant of *Arabidopsis Thaliana* Deficient in a Chloroplastic Starch-Hydrolyzing Enzyme". *Plant J.*, vol. 15, pp. 357-365, 1998.

Asbesto: un peligro latente para la salud¹

Ma. Concepción Fortes Rivas
Investigadora de la Dirección de Posgrado e Investigación
Universidad La Salle
E-mail: cfortes@ci.ulsal.mx

Brenda Elizabeth Garza Sandoval
Egresada de Administración, Escuela de Ciencias Administrativas
Universidad La Salle
E-mail: begs@prodigy.net.mx

[Recibido: Noviembre de 2005. Aceptado: Diciembre de 2005](#)

RESUMEN

El asbesto es un material utilizado ampliamente en el mundo, incluyendo México, cuyos efectos negativos en la salud están comprobados. Hasta la fecha no se ha demostrado con certeza que exista un límite seguro de exposición en el que no se corra el riesgo de contraer algunas de las enfermedades asociadas con ello y sólo en ciertos gobiernos las medidas preventivas han sido realmente implementadas, por lo que es urgente que nuestro país adopte una conciencia real sobre este problema y se haga algo más que sólo establecer estándares de emisión permitidos.

Se pretende crear conciencia en el lector sobre el peligro que para la salud representa, mediante límites más seguros con una buena legislación y propuestas.

Palabras clave: asbesto, salud, límites, legislación, propuestas.

ABSTRACT

As it is mentioned in the previous paper, asbestos is a material widely used in the world, including Mexico, whose negative effects on human health have been verified. To date no one has been able to show with certainty that there is a safe limit of exposure to the material without risks of contracting some of the diseases associated with them. A few governments have taken measures to prevent. That is the reason why it is urgent that our country develops a real awareness about this problem. We should go beyond establishing desirable standards of exposure.

This last part of paper has the purpose of developing in the readers the consciousness on the hazard at the health. It is necessary to comprehend the importance to limits with appropriate laws and proposals.

Key words: asbestos, health, limits, laws, proposals.

INTRODUCCIÓN

En este artículo se tiene como meta crear conciencia en el lector sobre el peligro que la exposición² al asbesto representa a la salud.

¹ Trabajo asesorado por el primer autor para que la alumna efectuara su Servicio Social en el periodo 2001-2002.

Existen grupos ambientalistas que han dado a conocer los peligros que representa para la salud y la respuesta de algunas empresas y gobiernos ha sido la sustitución de éste por otros materiales que permitan minimizar los daños. En algunos países se ha prohibido radicalmente su empleo; sin embargo, no ha sido divulgada, y es aquí donde se percibe la necesidad, de analizar la situación en México.

En 1999, la disminución en la utilización del asbesto y la posibilidad de una prohibición parcial de su uso, llevaron a las compañías mineras a laborar campañas especiales de publicidad para aumentar el consumo de las fibras provenientes de las minas de otros países. En México desde entonces existen muchas solicitudes de permisos para el establecimiento de nuevas plantas que lo involucran en sus procesos³.

Sin embargo, actualmente en el ambiente industrial y no industrial, continúan tolerándose exposiciones masivas con mínimos esfuerzos para controlarlas.

1. EXPOSICIÓN

La exposición a las fibras de asbesto ocurre en 3 fuentes diferentes (2, 4, 5):

1. **Ocupacional** es el lugar de trabajo⁴: minado, molienda, producción y manejo en fábricas; en operaciones de limpieza de edificios cubiertos por aspersión (*Skid More y Jones, 1975*), durante el uso de ropa aislante (*Gibbs, 1975*) y en construcción, medicinas, reparación y mantenimiento de frenos, instalación de aislantes, cosméticos, suministro de agua, bebidas, estructuras, empaques, soportes de rieles y aviones; materiales de quebrado de maquinaria, frenos y clutches para coches⁵ y camiones, talco, etc.

2. **Doméstica** se produce en los familiares de los trabajadores del asbesto al quedar fibras en la ropa de trabajo, zapatos, pelo, equipo, etc., y llevarlas al hogar. Y va en aumento en las reparaciones y mantenimiento hechas por uno mismo (fricción o aspersión),⁶ como serruchar, romper o taladrar en construcciones prefabricadas como láminas, equipos para horneado y calentamiento, compuestos de unión de paredes, rellenos plastificantes, cementos, aplicado en las superficies interiores de edificios, papel maché usado por niños en escuelas, tejidos contra incendios y otros (6).

3. **Ambiental** se da en los países donde se explota el mineral, Australia, Sudáfrica, Canadá, etc., en varios cientos de kilómetros a la redonda con los polvos de las fibras, donde el subsuelo es rico como Turquía, Córcega, Chipre, en los glaciares⁷ y cubiertas de hielo de todo el mundo,⁸ en la superficie de la tierra en forma natural, en la mayoría de los mantos acuíferos, aguas superficiales y en cuantiosas redes para transportar agua.⁹

² Es la situación en la que una persona puede tomar contacto con un elemento capaz de generar un daño, a través de cualquier vía (inhalatoria, dérmica y digestiva).

³ Hoy es uno de los principales maquiladores proveniente de Canadá y Brasil, donde se ha triplicado la cantidad de manufacturados y más del 60% se exporta a EE.UU.

⁴ Especialmente, las empresas que desarrollen operaciones en las que los trabajadores estén o sean susceptibles de estar expuestos al polvo que contenga fibras: construcción, aeronáutica, albañilería, ferroviaria, farmacéutica, automotriz, textil, tintorería industrial, extracción, demolición, transporte, producción y reparación de zapatos de freno, recubrimientos de tuberías y calderas, naval, mantenimiento y destrucción de residuos, nuclear, fabricación de filtros, aislamiento, etc.

⁵ Su uso es la causa principal de la presencia de fibras de asbesto en los ambientes urbanos.

⁶ En muchos productos las fibras están unidas estrechamente a la matriz o encapsuladas.

⁷ Un estudio de la EPA muestra que las aguas naturales de varios sitios contienen millones de fibras por litro, lo mismo se reportó en Canadá, en donde se afirma que la disgregación y erosión natural lo continúan desprendiendo y depositando.

⁸ Analizado por el Comité de Información sobre Asbesto-Benelux.

⁹ Kuschner M. Lee R. Robeck G.G., *A study of the Problem of Asbestos in Water, American Waters Works Association.*

Movilidad en el aire (7)

Se puede decir que la principal vía de entrada de las fibras de asbesto en nuestro cuerpo¹⁰ es la respiratoria. Este sistema cuenta con mecanismos de defensa que tratan de eliminarlas desde el instante que ingresan en la nariz. Sin embargo, muchas consiguen llegar hasta los alvéolos pulmonares. Una vez dentro, los mecanismos de defensa del organismo tratan de descomponerlas y expulsarlas, pero a pesar de estos esfuerzos, siguen siendo muchas las que consiguen quedarse y permanecer durante mucho tiempo. Como resultado, las medidas que se tomen para minimizar la exposición, traerán reducción del riesgo en la salud.

En las investigaciones médicas que se han efectuado, se determinó que el conflicto aumenta a medida que el material se va transformando en fibras, clasificándose por su peligrosidad básicamente en 2 factores:

A. **Friabilidad.** En términos técnicos es la probabilidad o capacidad de que las fibras se rompan y se desprendan al aire, clasificándose los materiales en (6):

- *Friables:* son los más peligrosos porque cuando están secos pueden simplemente con la presión de la mano, desmenuzarse, pulverizarse o reducirse a polvo, como los revestimientos de superficie.
- *No friables:* los que están firmemente retenidos y no es fácil que se liberen, encontrándose pinturas, los de asbesto-cemento, colas, masillas, etc., y se pueden convertir en el anterior por intervención agresiva, degradación o envejecimiento.

B. **Estado de conservación de los materiales y riesgo.** Como norma general, los materiales que contienen un alto porcentaje que se dañan con mayor facilidad, suponen un mayor nivel de riesgo. Tienen que periódicamente identificarse y controlarse. La reducción al mínimo o la prevención puede asegurarse por una serie de medidas en el mantenimiento y, si es necesario, su retirada/eliminación bajo estricto control.

Límites (7)

No todas las fibras son igual de peligrosas. Su capacidad de penetración en el organismo está determinada por distintas variables, siendo las más peligrosas las que cumplen:

- Tamaño igual o mayor a 5 μ de longitud.
- Diámetro inferior a 3 μ .
- Relación longitud-diámetro mayor de 3.

Desde su lugar de origen, las fibras pueden viajar distancias significativas con muy bajas velocidades de sedimentación.

Independientemente de la composición, los parámetros que determinan la peligrosidad frente a una exposición del asbesto son (8):

- Concentración¹¹ del polvo (F/cm^3),
- Tipo que se respira,
- Tiempo de exposición,
- Ritmo respiratorio (asociado al esfuerzo físico básicamente) *versus* condiciones termohigrométricas,

¹⁰ Algo de asbesto puede atravesar la piel. La mayor parte de las partículas visibles, como polvo que se ve a través de un rayo de luz, no es capaz de llegar al pulmón, a las regiones más profundas.

¹¹ Un metro cúbico es aproximadamente la cantidad de aire que usted respira en 1 hora y equivale a un millón de cm^3 o ml.

- Condiciones anatómicas y funcionales de la persona,
- Efecto sinérgico del humo del tabaco.

En general, las partículas de cualquier sustancia en forma de polvo con tamaño 0.5-5 micrones¹², son capaces de llegar a depositarse en los alvéolos pulmonares. Las mayores tienden a filtrarse a través de las vías respiratorias altas y la naso-faringe, mientras que las más pequeñas permanecen suspendidas en el aire, y son expiradas. Sin embargo, el asbesto es una sustancia excepcional y rompe esta regla general: las fibras de cualquier tamaño penetran hasta las regiones respiratorias del pulmón y ahí ejercen sus efectos destructivos.

A partir de esto se considera una concentración promedio permisible (CPP) o un valor límite de exposición (TWA) que se define como la concentración máxima permitida a la que puede estar expuesto un trabajador durante 8 horas diarias y 40 semanales sin sufrir daños a la salud y se expresa en F/cm³ (4).

Éste no debe superarse aunque no se ha establecido el nivel más pequeño por debajo del cual no plantee riesgos cancerígenos. De acuerdo a la EPA y otras organizaciones que aportan los estudios epidemiológicos que se van realizando, se debe usar únicamente como guía en el control de riesgos a la salud para prohibirlo y forzar su sustitución. En la Unión Europea para el crisotilo es de 0.6 F/cm³ y para las restantes variedades, puras o mezcladas, incluidas con crisotilo, 0.3 (9).

En 1997, EE.UU. propone por medio de la Conferencia Americana de Higienistas Industriales del Gobierno (ACGIH)¹³ un TLV¹⁴ de 0.1 F/cm³ para todos los tipos de asbesto.¹⁵ Además, en 1994, la Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA)¹⁶ adoptó legalmente el valor PEL (*Permissible Exposure Limit*) de 0.1 en el mismo tiempo,¹⁷ con un límite máximo de 1 para 30 minutos de exposición que excedan los límites y el Departamento de Salud de Minnesota, para interiores de 0.01 (3, 4, 8, 10).

Por lo que, el Departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS),¹⁸ la OMS, el Instituto Nacional para la Salud y la Seguridad Ocupacional (NIOSH)¹⁹ y la EPA.²⁰ han determinado que es carcinógeno para los seres humanos, siendo la crocidolita, la más peligrosa (9).

Lugares

El asbesto puede localizarse en (3):

¹² En el sistema métrico decimal, es una unidad de la longitud igual a una milésima de milímetro.

¹³ ACGIH: (<<http://www.acgih.org/home.htm>>) American Conference of Governmental Industrial Hygienists.

¹⁴ Threshold Limit Values o TWA, nivel máximo permitido y se expresa en m³ de aire por litro de disolvente evaporado o producto pulverizado.

¹⁵ Aunque también plantea 2 para crisotilo, 0.5 para amosita y 0.2 para crocidolita,

¹⁶ OSHA: (<<http://www.osha.gov/>>) Occupational Safety and Health Administration.

¹⁷ 0.1 F/cm³ o F/ml equivale a 100,000 fibras de longitud igual o mayor a 5 μ.

¹⁸ DHHS: U.S. Department of Health & Human Services (<<http://www.hhs.gov/>>).

¹⁹ The National Institute for Occupational Safety and Health. NIOSH REL recomienda un tiempo límite promedio de exposición de 8-10 horas, (<<http://www.cdc.gov/niosh/homepage.html>>).

²⁰ Se registra que una concentración de asbesto en el aire (nanogramo/m³ = NG/m³ o un millón de fibras de crisotilo por metro cúbico), bajo diferentes circunstancias presenta: cerca de la aspersión: 10-1,000; operaciones de molienda: 10-5,000; ropas de trabajadores: 100-500; zonas rurales: 3x10⁻⁶-3x10⁻⁹; otras exposiciones ocupacionales: 1,000-100,000; en ciudades y áreas industriales: 10-100, bajo condiciones moderadas de tráfico: 500-4,700 y en la intersección: 1,000, en estudios de ACGIH y Asociación Americana de Higiene Industrial (The American Industrial Hygiene Association = AIHA) indican que se han situado en casas habitación contaminadas: abajo de 1,000; el aire urbano de demolición de edificios: 600-6,000 y en la vecindad de tiraderos de desechos y disposición de productos: 60-100 millones.

1. El **agua potable**²¹ de cañerías de cemento (restos de FeO) o de fuentes naturales (carbonato de calcio) pueden contenerlo, produciendo enturbiamiento ya que las fibras no son hidrosolubles.
2. El **aire**, su permanencia depende del tamaño de la fibra, la cual puede viajar cientos de kilómetros y las partículas de polvo se transforman en cortas y finas (<3μ) a través de la meteorización.
3. El **suelo**, llegan, se acumulan y pueden pasar al aire por la acción del viento. Las partículas mayores de 2 μ no ingresan pero sí se sedimentan cuando son arrastradas por el agua, en donde no se considera peligroso para la salud.

Riesgos a la población

Para descubrir si existe temor de respirar fibras, debe realizarse una valoración ambiental previendo 2 tipos de muestreos (8):

- **Muestra estática.** Es la que da la distribución temporal y espacial de las fibras en el aire, tomándose cerca de las fuentes de contaminación y en distintos lugares de la zona de trabajo.
- **Muestra individual.** Es la que sirve para evaluar el riesgo a que está sometido cada trabajador y se tomará durante la ejecución normal de trabajo y en toda la jornada.

Todo esto con la ayuda de una Agencia Estatal de Salud o bien, una compañía de estudios y pruebas confiable que puedan captar muestras del material y analizarlas para poder determinar la existencia real de una alarma; ésta es una medida recomendada a la población de países como EE.UU., en donde se hallan oficinas y empresas dedicadas a la evaluación profesional, sin embargo, en México y Latinoamérica en general, esto no sucede y hay poca información entre la población (4).

Luego, para evaluar y controlar los riesgos, se localizan los materiales como una medida a adoptar, incluyendo 4 etapas (8):

- Examen de los datos y documentos del edificio para buscar referencias a la utilización de estos materiales en su construcción o en obras posteriores.
- Ubicación e identificación de los materiales que contienen asbesto.
- Toma de muestras de los materiales que resulten sospechosos para confirmar o descartar la presencia.
- Realizar un mapa de la situación y señalización de los materiales confirmados o sospechosos.

Si en la evaluación inicial se ha comprobado su presencia, se procederá a (8):

1. **Registro.** Antes de practicar cualquier trabajo debe establecerse un registro de las áreas del edificio que lo contienen²².
2. **Plan de trabajo.** Elaborar un diseño del trabajo en obras de reparación y demolición que permita que la formación de polvo sea lo más baja posible; proteger a los trabajadores contra la exposición y transportar los residuos del derrumbe.
3. **Información.** Notificar a los trabajadores del riesgo y el peligro para la salud, limpiar el área de trabajo para reducir al mínimo la producción de polvo e indicar la forma que baje la diseminación.
4. **Formación:** Capacitar y efectuar los trabajos sólo personal especializado.

²¹ La EPA ha propuesto una concentración límite de 7 millones de fibras por litro de agua potable para fibras de 5μ de longitud o más.

²² Se obliga al patrón a mantener registros exactos durante 30 años de todas las mediciones tomadas para controlar la exposición de los trabajadores e incluirán: nombre, número de seguridad social, fecha de la medición, operaciones que abarca, muestras y métodos de análisis utilizados, evidencia de su exactitud, número, duración, resultados de las muestras y tipos de protectores de respiración utilizados.

En un edificio se pueden hallar diferentes tipos de materiales conteniendo asbesto, siendo sus formas más comunes:

- **A granel** como borra de relleno (cámaras, puertas ignífugas, etc.) y enlucido o proyectado (flocado) sobre superficies (techos, paredes y estructuras metálicas).
- **Placas o paneles** (cámaras aislantes, tabiques, falsos techos, etc.).
- **Laminados de papel y cartón** (telas asfálticas, composites, etc.).
- **Tejidos** en forma de cordones o trenzas, (elementos de protección frente al calor, juntas, calorifugados, etc.).
- **Asbesto-cemento** (tuberías, tejas, placas planas y ondulada, etc.).
- **Incorporado** a diversos ligantes (grafito, resinas, alquitranes, metales) o materiales plásticos (losetas vinílicas, pinturas, masillas, sellantes, etc.).

En México, podemos apreciar muy viejas construcciones realizadas antes a 1978 que contienen asbesto, sin embargo, sus habitantes no están enterados del riesgo al que están expuestos y por ende, en muy pocos casos solicitan una evaluación de sus condiciones; lo que provoca que vivan bajo un peligro de salud latente (3, 11).

A nivel mundial, un estimado de 1.3 millones de trabajadores de la industria y la construcción tienen una exposición significativa en su trabajo, sobre todo en las remodelaciones, demoliciones, aislantes y en la fabricación de textiles. Esta situación obliga a la creación de normas que regulen el uso y exposición (4). En México no hay un seguimiento a esta problemática. Sin embargo, deben incluirse²³:

- Sólo se autorizará a permanecer en las áreas reguladas al personal que utilice equipo de respiración apropiado, por lo que, está prohibido aplicarse cosméticos, comer, fumar, beber y masticar tabaco o goma.
- Contar con un área de contrapresión de aire los trabajadores con personal competente autorizado por las autoridades para control, procedimientos descontaminantes y consumir sus alimentos.
- Colocar las precauciones de manejo en los materiales (materia prima, desperdicios, escombros, pedazos, mezclas, etc.).
- Se les requiere mantener limpios los cuartos que deben suministrar los patrones a los trabajadores que trabajan donde se exceden los límites permitidos.
- Proporcionar armarios o almacenes a los trabajadores que les facilite separar la ropa de calle y la de trabajo (la que no se podrá sacar ni vestir fuera) y su mantenimiento.
- El cuarto contará con material impermeable, lo mismo las maletas de trabajo y los contenedores para los contaminantes.
- Se someterán a una revisión física antes de ser asignados a labores en que estarán expuestos a concentraciones volátiles o a niveles que exceden los límites permitidos. Posteriormente, se efectuarán en forma anual durante su vida laboral y al terminar durante 10 años más.

Sustitutos del asbesto (12, 13)

Se han desarrollado productos alternativos o sustitutos de las fibras de asbesto que se pueden dividir en 3 grupos (8):

- **Grupo A:** Comprende las fibras minerales artificiales (FMA) o lanas aislantes, como la de vidrio con resinas, la de minerales (de roca y de escoria) y las refractarias, como las cerámicas: alúmina (Al_2O_3); circonia (ZrO_2); boro (B); nitruro de boro (BN); carburo de

²³ Su presencia puede tener un doble origen: se construyó o reparó con materiales que lo contienen o se han introducido partes en nuevas estructuras. Actualmente, el riesgo más elevado es el de los trabajadores que participan en tareas de eliminación y que lo hallen de imprevisto, reparando y manteniendo edificios, fábricas, buques y trenes.

silicio (SiC); nitruro de silicio (Si₃N₄); sílice (SiO₂); silicato de aluminio (Al₂O₃SiO₂) y aluminosilicato de boro (Al₂O₃SiO₂B₂O₃), cromo (Al₂O₃SiO₂Cr₂O₃) y zirconio (Al₂O₃SiO₂ZrO₂).

▪ **Grupo B:** Incluye diferentes tipos de fibras como las orgánicas sintéticas; para reforzar el cemento las de polipropileno (PP) [-CH₂-CH(CH₃)-]_n; las de alcohol polivinilo (PVA) [-CH₂-CHOH-]_n; las de polietileno (PE) [-CH₂-CH₂-]_n y las acrílicas (PAN) [-CH₂-CHCN-]_n. Y textiles con propiedades especiales: de aramida como poliamidas alifáticas (Nylon) (PAM) [-CO-(CH₂)₄-CO-NH-(CH₂)₆-NH-]_n, poliamidas aromáticas (Kevlar) (PAM) [-CO-C₆H₄-CO-NH-C₆H₄-NH-]_n; y sintéticas: politetrafluoroetileno (PTFE) [-CF₂-CF₂-]_n y poliéster (PET) H[-(CH₂)₂-O-CO-C₆H₄-CO-]_nOH. También se hallan las orgánicas de carbón y las basadas en poliacrilonitrilo (PAN) y rayón. Por último, las de acero.

▪ **Grupo C:** Fibras orgánicas naturales como yute, abacá, lana, bambú, bagazo, pita, plumas, cáñamo, esparto y seda natural.

A continuación se mencionan algunos estudios sobre los posibles riesgos que representan para la salud los sustitutos de los productos que lo contienen, siendo necesario disponer de la máxima información sobre propiedades, precio y disponibilidad en una alternativa válida.

2. DAÑOS A LA SALUD

Fisiopatología (14, 15, 16)

Las partículas que se depositan en el epitelio de la mucosa ciliada del árbol bronquial suben por la acción del aparato mucociliar a la faringe posterior, y ahí son tragadas, después de lo cual su destino es incierto. No puede ser descartada la posibilidad de una relación entre fibras ingeridas y el aumento de neoplasmas gastrointestinales.

Dado el poder penetrante de estas fibrillas desnudas, no es sorprendente encontrar derrames pleurales “idiopáticos”, fibrosis pleural, calcificación pleural y neoplasma.

Sin embargo, se debe señalar que los cuerpos de asbesto se encuentran en muchos tejidos extrapulmonares, incluyendo amígdalas, tórax y ganglios linfáticos, pleura, peritoneo, hígado, bazo, riñón y glándulas adrenales e intestino delgado.

La exposición²⁴ intensa lo causa igual por un corto tiempo o a concentraciones bajas durante largo tiempo y la relación dosis-respuesta con la enfermedad se mantiene, para los casos de fibrosis, de leve a moderada. Existen trabajos realizados (*Parkes y Turner-Warwick, et al.*), en pacientes que han planteado la posibilidad de mecanismos inmunológicos responsables de la progresión. Típicamente, los niveles elevados de anticuerpos antinucleares, los factores reumatoideos encontrados y una disminución progresiva del recuento leucocitario con la progresión de la fibrosis, llevan al compromiso del sistema inmunocelular, todo lo cual sugiere un mecanismo de autoperpetuación de la respuesta del huésped que acelera la progresión de la fibrosis.

Todo esto se debe a la sedimentación, mecanismo responsable de la mayoría de los depósitos en las vías aéreas proximales. El llamado impacto inercial es responsable de los depósitos en la nariz y vías mayores y la intercepción, del de partículas fibrosas e irregulares. Las partículas fibrosas largas tienden a orientarse en el sentido de la corriente aérea, hasta que son interceptadas por colisión especialmente en las paredes

²⁴ Los síntomas a corto plazo son: falta de aliento, dolor en el pecho y abdominal e irritación de la piel y mucosas; y a largo plazo o crónicos: reducción de la función pulmonar, tos seca, dificultad para respirar, coloración azulada de piel y mucosas y ensanchamiento de dedos.

de los bronquiolos terminales y respiratorios, en las bifurcaciones. La difusión afecta sólo a las partículas más pequeñas (menos de 0.1 μ).

Las fibras más cortas (10 μ o menos) son fagocitadas o rodeadas por macrófagos que forman granulomas (fig. 1). Las más grandes, simultáneamente favorecen la precipitación de proteínas y Fe endógeno y la dejan como núcleo, constituyendo el llamado cuerpo ferruginoso o de asbesto. Éstas son estructuras delgadas, alargadas, como bastón, amarillo cobrizos, de hasta 50 μ de largo. La envoltura proteínica está habitualmente segmentada y los extremos son bulbosos. El hallazgo de cuerpos de asbesto en pulmón o expectoración indica sólo exposición, no es una prueba de enfermedad y se hallan en ciudadanos de las metrópolis, no expuestos, hasta en un 60% de las autopsias. En esta fase se hallan abundantes cuerpos ferruginosos.



Fig. 1. Un macrófago engloba una fibra de asbesto. En unos años, éste será el punto central del inicio del cáncer de pulmón

El proceso evoluciona hasta incluir los alvéolos vecinos, causando el engrosamiento difuso de la pared alveolar con fibrosis peribronquiolar y perivascular, comprometiendo así las pequeñas arteriolas que nutren la red capilar alveolar distal.

Diagnóstico (14, 16)

Los niveles bajos de asbesto pueden medirse en orina, heces, líquidos mucosos o lavados pulmonares de la población en general y los mayores que el promedio, en tejidos que confirman la exposición, pero no predicen si le afectará la salud.

Para evaluar estas enfermedades se recomienda una historia completa, examen físico y pruebas de laboratorio con la importancia pertinente al cual se le agrega:

Historia Clínica

Examen Físico

Procedimientos de laboratorio

En la evaluación del trabajador que se sabe o se sospecha que ha estado expuesto al asbesto, se deben realizar las siguientes pruebas y subrayar los hallazgos anormales sugerentes de complicaciones:

Radiografía del Tórax²⁶

Electrocardiograma

Citología de Expectoración

Pruebas funcionales pulmonares

Procedimientos Especiales:

- Si se sospecha una masa pulmonar: Broncoscopia y/o toracotomía para diagnosticar adenocarcinoma.

²⁵ Hábitat. Brailovsky, A. E. ¿Está prohibido el asbesto? Buenos Aires, Argentina, [En línea] Disponible: 10 de septiembre del 2005. <<http://www.revistahabitat.com/boletin/numero8>>

²⁶ Es la mejor herramienta para diagnosticar y detectar cambios en los pulmones junto con pruebas de función pulmonar y sondeos computarizados en 3 dimensiones.

- Si se identifica una masa pleural: Toracocentesis y/o biopsia pleural para diagnosticar el mesotelioma.
- Si se sospecha un tumor peritoneal: Paracentesis y/o laparotomía para diagnosticar el mesotelioma.

Historia Ocupacional

Enfermedades (13, 14, 16)

La exposición al asbesto puede producirnos diversas enfermedades (fig. 2) entre:

- Asbestosis²⁷,
- Cáncer de pulmón,
- Mesotelioma maligno (pleural o peritoneal).

Se ha encontrado también asociación a otros tipos de cánceres, como gástrico, de laringe y hay sospecha, aún no confirmada, de que puede producir de riñón, ovario, mama y/o algunas afecciones del corazón.

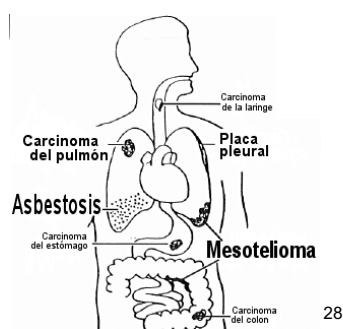


Fig. 2. Enfermedades producidas en el hombre por el asbesto

La identificación y el tratamiento temprano de todo cáncer en una persona aumenta la calidad de vida y la sobrevivencia.

Asbestosis²⁹

Es una enfermedad pulmonar³⁰ de desarrollo lento y paulatino que está relacionada con la inhalación de partículas de asbesto (5 y 100µ de longitud) por largo tiempo y puede producir lesiones que parecen cicatrices en el pulmón y en la pleura. Se suele desarrollar tras un periodo de exposición de 1 a 5 años, aunque se fija como tiempo medio de latencia³¹ de 15 a 30 y aparece con una sola fibra de cualquier tipo del mineral (2, 17).

Respirar niveles más bajos puede producir alteraciones en la pleura, llamadas placas. Las placas pleurales pueden ocurrir en trabajadores y ocasionalmente en gente que vive en áreas con altos niveles ambientales. Los efectos sobre la respiración no son serios

²⁷ También llamada asbestosis parenquimatosa o pleural, fibrosis pulmonar o pleural, engrosamiento, calcificación o derrame pleural.

²⁸ Montorsi, W., Polvo, fibra de asbesto: dispersión en el ambiente. Milán, Italia, 1996-1997. [En línea] Disponible: <http://www.dsa.unipr.it/giavelli/Tesina_Montorsi/montorsi.html>, 27/VIII/05. Traducida al español.

²⁹ Occupational Safety & Health Administration. US Department of Labor. Better Protection Against Asbestos in the Workplace. 1993. [En línea]. Disponible: 18 de julio de 2002. <<http://www.Oshaslc.gov/SLTC/asbestos>>.

³⁰ Afecta los tejidos de los pulmones, daña su elasticidad hasta el grado de impedir el intercambio de gases, restringe la respiración conduciendo a disminuir el volumen, produce una inadecuada oxigenación de la sangre e incrementar la resistencia de vías respiratorias.

³¹ Es el que transcurre entre la exposición a un riesgo y la aparición de la enfermedad.

generalmente, pero la exposición a medidas más altas puede generar un engrosamiento de la pleura que puede restringirla (2).

La apariencia de un pulmón asbestósico dependerá de la severidad al morir.³²

La Fibrosis Pulmonar Masiva con lesiones conglomeradas no es frecuente, pero puede ocurrir en ausencia de tuberculosis, y sugiere una exposición al polvo. Ocasionalmente, se ha observado un nódulo fibrótico solitario que se denomina asbestoma.

Los síntomas, en la fase inicial cursa sin ellos. En estados avanzados aparece disnea (fatiga), tos seca, cianosis, fallo cardíaco por insuficiencia respiratoria, etc.

El pronóstico, es una enfermedad grave que evoluciona lentamente y de manera progresiva, incluso después de haber cesado la exposición, hasta la insuficiencia respiratoria y cardíaca pudiendo llevar a la muerte.

Tiene tratamiento, pero en la actualidad no hay curación. A los primeros síntomas se aconseja dejar de fumar, retirar al trabajador de la fuente de exposición y realizar una vigilancia médica periódica.

Cáncer de pulmón

Es un tumor maligno de la cubierta de los bronquios, el cual crece a través del tejido que rodea, invadiéndolo poco a poco y, a menudo obstruyendo el aire.

Existen distintas clases pero el asociado a la exposición puede pertenecer a cualquier tipo histológico. Quizá va unido a una asbestosis previa o no y tiene un periodo de latencia mínimo de 10 años hasta 30 (17).

Por sí sola, la exposición incrementa 5 veces el riesgo de contraerlo y si además se es fumador se ve aumentada en 90 (1).

No suele producir síntomas en su inicio. Normalmente, cuando aparece suele estar en una etapa avanzada. La tos persistente es el más frecuente y luego, están: dolor de pecho, toser sangre, dificultad para respirar, cansancio, pérdida de peso, ronquera y silbancias.

El pronóstico principal es la muerte por cáncer y altamente letal, ya que su detección precoz es escasa y el periodo de latencia es muy prolongado.

Existe un tratamiento pero su efectividad es limitada.

Mesotelioma maligno pleural o peritoneal

Es un cáncer de las células que constituyen el forro que recubre la parte exterior de los pulmones e interior de las costillas (pleura) y/o alrededor de los órganos abdominales (peritoneo). Se trata de un tumor raro y es más frecuente el pleural que el peritoneal.³³ Tiene un periodo de latencia de pocos años a más de 40.

³² Teniendo la siguiente graduación de las lesiones: 0: no hay fibrosis asociada. 1: la fibrosis afecta como mínimo a las paredes de un bronquiolo respiratorio, con o sin extensión a los tabiques de la capa inmediatamente contigua de alvéolos. 2: se añade una afectación de los conductos alveolares o de 2 o más capas de alvéolos contiguos. 3: junto la coalescencia de los cambios fibróticos. 4: formación de nuevos espacios, más anchos que los alvéolos, se conoce como apanalamiento.

³³ 88% de los casos son atribuibles al asbesto, de los cuales 62% es de exposición ocupacional y 26%, ambiental o doméstica.

La crocidolita es la variedad que más produce y a diferencia de las otras enfermedades, los niveles de exposición bajos a las fibras pueden producir uno maligno. En este caso, el tabaquismo no tiene influencia (17).

Los síntomas, a veces se diagnostican de manera casual antes de que aparezcan. En el caso del mesotelioma pleural, incluye falta de aliento, debilidad, pérdida de peso y de apetito, dolores en el pecho y tos persistente. En el del peritoneal, engloba dolores abdominales, debilidad, pérdida de peso y apetito, náuseas e hinchazón en el abdomen (2).

El pronóstico, en el 85% de los casos, se constata la exposición laboral al asbesto. Hasta la fecha no tiene cura y el tiempo medio de supervivencia es aproximadamente de 1 año.

En la actualidad no hay tratamiento, pero sí recursos médicos para reducir el dolor.

De acuerdo a la OMS y a la Organización Internacional del Trabajo (OIT³⁴), más de 9 millones de trabajadores están en riesgo de desarrollar alguna enfermedad, cuya incidencia es de 4 casos por cada 10 mil. Además, cada año, al menos 100 mil mueren de este cáncer, esta cifra no incluye a las miles de personas incapacitadas y en México, se detectan anualmente 100 nuevos casos.

3. REGLAMENTACIÓN (16, 18, 19)

Durante muchos años los efectos en la salud han sido objeto de mucha controversia, la falla en responder a los primeros casos sobre su potencialidad de causar enfermedades llevó a la omisión de las medidas necesarias para controlar la exposición, se incrementó su utilización sin tomar en cuenta los riesgos, lo cual explica la lentitud por un lado, el desarrollo de procesos de control y la búsqueda de substitutos, y por otro, la adopción de reglamentos específicos y efectivos de higiene y seguridad.

Para 1918, las compañías de seguros en EE.UU. y Canadá habían dejado de vender pólizas a estos trabajadores, a pesar de que entonces solo había unos miles de ellos.

Durante los años 30 se empezaron a aplicar algunos reglamentos para esta industria cuyo objetivo principal era declarar a la asbestosis como enfermedad ocupacional y junto con la aprobación médica de los efectos nocivos en la salud, indujeron a algunos países a comenzar a medir la concentración de polvo en los lugares de trabajo; se controló en general y se captaron límites muy elevados que se mantuvieron durante los años 60. Desde esa fecha, gracias a los procesos logrados en la medición, se adoptó en varios países³⁵ el método del filtro de membrana y microscopía óptica. Y de ahí, un número cada vez mayor se fijaron por la vía legislativa los valores límites de μ/ml . No obstante, varían mucho uno de otro.

En vista de que se hace cada vez más patente el riesgo de cáncer, en los años 70 se pusieron en vigor reglamentos más estrictos relativos al ambiente de trabajo, así como prohibiciones o restricciones en su utilización, lo que afectó enormemente el consumo.

En 1973, la reunión de expertos patrocinada por la OIT, recomendó la adopción de un nivel de 2 F/ml, con relación al estado actual de conocimientos y técnicas de medición.

³⁴. OIT: (<<http://www.ilo.org/public/spanish/>>).

³⁵ Gran Bretaña y EE.UU., 1965; Canadá, 1974 y RFA, 1976.

A la vez, en 1980, en varios países³⁶ se introdujeron métodos gravimétricos para controlarlas tanto en su totalidad como en la fracción respirable; con base en esto se fijaron legalmente los valores límites (Tabla 1).

Como consecuencia, en 1980 el Consejo de Comunidades Europeas emitió en su Diario Oficial una reglamentación, en la que se clasifica al asbesto entre los contaminantes de primera categoría, que se examina dada su toxicidad y sus efectos potencialmente graves sobre la salud y el medio ambiente.

PAÍS	VALORES LÍMITES (F/m)
Japón	crocidolita: 0.2 Otros tipos: 2.0
Australia	amosita: 1.0 crisotilo: 1.0 crocidolita: 0.1
EE.UU.	asbesto: 2.0 0.2 después de 1986
Canadá	amosita: 0.5 crisotilo: 1.0 crocidolita: 0.2
Antigua URSS	Polvo que contiene más de 10% de asbesto: 2mg/m ³
Finlandia	asbesto: 2.0
Francia	asbesto: 2.0
Alemania	asbesto: 1.0
Países Bajos	crisotilo: 2 crocidolita: prohibida
Suecia	asbesto: 1.0 salvo crocidolita
India	amosita: 0.5 crisotilo: 2.0 crocidolita: 0.2 otros: 2.0

Tabla 1. Límites de exposición al asbesto en varios países

En 1986, la Carta de Ottawa para la Promoción de la Salud de la Organización Mundial declaraba que: "El cambio en las formas de vida, trabajo y ocio afectan de forma muy significativa a la salud. El trabajo y el ocio deben ser una fuente de salud. El modo en que la sociedad organiza el trabajo debe contribuir a la creación de una sociedad saludable". De ahí, la EPA propuso un reglamento prohibiendo la fabricación, uso e importación de tuberías de asbesto-cemento, filtros para techos y pisos, losetas de vinil-asbesto y ropa de asbesto, los demás usos serán eliminados en etapas, por ejemplo, los materiales de fricción 5 años después de aprobarse el reglamento. Y la ONU estudió a través del Centro de Estudios Transnacionales, un código de conducta para la transferencia de tecnología a la producción de productos tóxicos.

En 1991 el Banco Mundial estipuló, como política, su preferencia de no financiar la manufactura o uso de estos productos.

³⁶ Canadá, EE.UU., la antigua URSS, Gran Bretaña y otros.

El 4 de mayo de 1999, la Comisión Técnica de la Unión Europea aprobó la prohibición del uso de cualquier tipo de asbesto a partir del 1 de enero del 2005 queda prohibido en varios países³⁷ de forma tajante cualquier uso en industria, construcción, etc

Es muy importante considerar que el convenio actual de que todos los límites de exposición adoptados referentes a fibras mayores de 5µ de largo, ha sido únicamente elegido por conveniencia de las evaluaciones microscópicas, que realizan las instituciones responsables en el cumplimiento de reglamentos y no necesariamente corresponden a una relación entre tamaño y prevención de las enfermedades descubiertas.

Estándares de emisión

La intención internacional de los estándares de emisión propuestos a la atmósfera es minimizarlos, de todas las fuentes estacionarias, de acuerdo a la disponibilidad de una caracterización lo suficientemente definida y a las técnicas de control factibles. En donde no sea práctico utilizarlas, se prohibirá directamente las actividades y se alentará al sustituto.

Debido a que no se encuentran disponibles técnicas de rutina estandarizadas para muestreo y análisis, los estándares no se dan en términos de valores numéricos, sino en prácticas de control, las que las limitan a un nivel aceptable, mediante (4):

- Utilización de filtros de bolsas para limpiar los gases extraídos forzosamente de industrias de manufactura y operaciones de explotación, molienda y fabricación.
- Prohibición de ciertas formas como aplicación para protección contra fuego y aislante por aspersión.
- Control de emisiones atmosféricas indirectas de partículas en los lugares de manufactura y fabricación.
- Eliminación de emisiones visibles de partículas de tiraderos de minerales, asociados con las actividades de extracción, molienda, manufactura y fabricación a través de campanas de extracción.
- Las del exterior permitidas serían equivalentes a aquellas alcanzadas, una vez que sea ventilado el espacio total de trabajo.

A continuación se presentan algunas reglamentaciones en las que se han establecido estándares:

Estados Unidos de Norteamérica

El estándar adoptado de no emisión visible a la atmósfera en el cual se cubren estipulaciones de demolición y renovación para todos los que sean desmenuzables y que lo contengan arriba del 1% en peso, se añade la prohibición de la aspersión en edificios, estructuras, tubos y conductores de cualquier material.

Las fibras que estén encapsuladas o impregnadas con un adhesivo resinoso o bituminoso durante la aspersión y no sean desmenuzables después de secarse estarán exentos a la reglamentación.

De acuerdo con el riesgo de cáncer asociado con la inhalación de fibras se prohibió su uso, venta y distribución, excepto para uso industrial.

³⁷ Se ha prohibido en: Alemania, Dinamarca, Argentina, Arabia Saudita, Eslovenia, Finlandia, Gran Bretaña, Emiratos Árabes, España, Chile, Austria, Bélgica, Francia, Grecia, Holanda, Italia, Noruega, Nueva Zelanda, Luxemburgo, Islandia, Polonia, Portugal, Suecia, República Checa y Suiza y los que restringieron: Brasil y Australia.

Canadá

Desde 1978, se establecieron nuevas reglamentaciones sobre emisiones de asbesto, que permitirían un máximo de 2 F/cm^3 para ser emitidas al aire alrededor de las operaciones de trituración, secado y molienda de áreas de almacenamiento de la fibra seca. Además, inmediatamente iniciarán operaciones de monitoreo en plantas individuales para permitir las instancias de ejecución e identificación de áreas problema.

Las autoridades están trabajando con los responsables de la extracción e industrias derivadas para lograr un mejor control en la disposición de desechos. Se prohibió la aspersión de productos usados para protección contra el fuego, entre otros.

Se planeó impedir su venta libre y en polvo a otros consumidores diferentes a los industriales; se reglamentó la etiquetación de sus productos y las prácticas de trabajo para el manejo y transporte de fibras libres.

Unión Europea

En 1977, la Comisión de Salud y Seguridad anunció la formación de un comité de asesoría sobre el asbesto y se aplicó un estatuto interno titulado: "Riesgos de Salud por Asbestos y Precauciones", diseñado para dar a conocer los nuevos descubrimientos; se recomendó que redujeran al mínimo las exposiciones de todas las formas de polvos, además que la exposición ocupacional y las mediciones se promedien en período de 4 horas y los períodos cortos no excedan nunca 10 minutos para 2 F/ml . Para la crocidolita, será 0.2 medidos cada 10 minutos.

Desde 1988, se instituyeron disposiciones legales contra el asbesto que:

- Limitan la comercialización y utilización junto con los productos que la contengan.
- Etiquetan los productos con este contenido.
- Protegen a los trabajadores contra riesgos ocupacionales.
- Luchan contra la contaminación atmosférica procedente de instalaciones industriales.

Marco jurídico mexicano (18)

En México, el 28 de enero de 1988 se publicó en el Diario Oficial de la Federación la Ley general del Equilibrio Ecológico y de Protección al Ambiente, artículo 111BIS en lo referente al asbesto como un contaminante atmosférico.

De ahí, la ley del Seguro Social, la Ley Federal del Trabajo, el Reglamento Federal de Higiene y Seguridad en el Trabajo y otras disposiciones legales semejantes, señalan que es responsabilidad del empleador mantener las condiciones adecuadas de seguridad e higiene en la empresa, cuidar de que las concentraciones de fibras se mantengan en las cifras más bajas, disponer de ingenieros y técnicos especializados que descubran con mediciones si las concentraciones son mayores que las permitidas, y se apliquen las medidas necesarias para abatirlas.

Aunque el responsable sea el empleador, los trabajadores, deben constituir parte de las Comisiones de Seguridad e Higiene, cuya responsabilidad es ayudar a la vigilancia del ambiente de trabajo para que éste se mantenga seguro e higiénico, a fin de que se mantengan concentraciones no peligrosas, cuidar de que se les hagan examen médico de admisión y periódicos a todos con minuciosidad, conocimiento y periodicidad señalados en la legislación correspondiente, estar conscientes de las enfermedades que pueden producirse, en especial los susceptibles y estar prevenidos contra el desarrollo precoz de las enfermedades.

Y es compromiso de ambos evitar vivir cerca de minas, molinos y fábricas en las que se obtiene, procesa o utiliza el asbesto; control adecuado de tiraderos para desperdicios; procurar que la ropa de trabajo se lave únicamente en la empresa con precauciones, desechar el hábito del tabaco y que los respiradores contra el polvo sólo sea una medida de emergencia temporal.

DECLARACIÓN CONTRA EL ASBESTO³⁸

La Comisión Especial sobre la Prevención de la Asociación Internacional de la Seguridad Social (AISS), reunida en Beijing el 16 de septiembre de 2004, durante la 28a. Asamblea General, adoptó la siguiente declaración, dirigida a quienes todavía lo usan o producen:

- Según el conjunto de datos epidemiológicos mundiales, el polvo de las fibras que se crea durante la extracción, transformación y utilización de todas las formas es cancerígeno para el hombre, siendo un mineral natural.
- Se utilizó durante todo el siglo XX para fabricar productos muy diversos. Independientemente de las transformaciones a que se someta, sus propiedades peligrosas siguen latentes.
- Ya se han pagado varios miles de millones de dólares en concepto de indemnización, y numerosas empresas han quebrado al no hacer frente a estas demandas.
- A pesar de las dramáticas consecuencias para la salud humana y las amenazas que representan para las economías nacionales, cada año todavía se producen y utilizan.
- Sólo al final de un proceso que ha durado más de 30 años, y tras haber encontrado sustitutos, algunos países industrializados han decidido prohibir totalmente la producción, usos y productos que lo contengan. En la actualidad, sólo se autorizan ahí las actividades encaminadas a la eliminación, descontaminación y mantenimiento de lo existente.
- Pueden transcurrir varios decenios entre la primera exposición y la aparición de los primeros indicios patológicos. Todos los países donde no se haya prohibido totalmente, serán víctimas de estos desastrosos efectos sanitarios y políticos.

Así, se exhorta a todos los países a prohibir cuanto antes la producción, comercio, utilización de todos sus tipos y productos que lo contengan.

PROPUESTAS PERSONALES:

Se propone llevar a cabo en México algunas de las siguientes acciones:

- Crear una Procuraduría o Comisión encargada de supervisar su uso y proteger el hombre de este nefasto efecto.
- Llevar a cabo programa que asegure el cumplimiento de la supervisión médica y ambiental de los trabajadores expuestos.
- Realizar un monitoreo del aire que permita conocer las zonas habitacionales e industriales de mayor exposición.
- Los edificios públicos tendrán avisos de precaución donde se hayan instalado.
- La demolición o remodelación de edificios que tengan materiales aislantes de asbesto se realizará por contratistas que tengan el entrenamiento adecuado y avalado por autoridades ambientales.
- Elaborar un programa de información y educación de los involucrados con relación a los riesgos de la salud debido a la exposición al asbesto y con relación a los métodos de prevención y control para garantizar que los trabajadores expuestos conozcan la forma de protegerse.

³⁸ Asociación Internacional de Seguridad Social. Declaración contra el amianto. [En línea] <<http://www.issa.int/span/domact/prev/asbestos.htm>>, 17 de agosto de 2005.

- Colocar rotulación y etiquetas con frases de precaución, en las bolsas de fibra de asbesto y los productos que lo contengan.
- Monitorear los edificios viejos en los que se sospecha su uso.
- Lo más importante empezar a prohibir su uso.

CONCLUSIONES

El asbesto es un material utilizado ampliamente en el mundo incluyendo México, cuyos efectos en la salud están comprobados. Hasta la fecha no se ha demostrado con certeza que exista un límite seguro de exposición en el que no se corra riesgo.

Con esto se puede decir que comprende 3 fases de exposición: una asociada a la extracción y manufactura del asbesto, entre 1920 y 1930; aunque la intensidad era muy elevada, el número de trabajadores afectados era limitado. Otra, a partir de 1940, que se caracterizó por el uso industrial a gran escala produciéndose un incremento sustancial en el número de obreros expuestos y una más reciente consistente en la exposición a millones de Tm colocadas en la anterior, en donde se empiezan a deteriorar por el uso y mantenimiento, desprendiéndose las fibras y apareciendo los mayores problemas de salud entre los que laboran ahí.

Hoy en día en México, es particularmente importante reforzar y promover las medidas de higiene y seguridad en las empresas, con objeto de disminuir la incidencia de las patologías y empezar a prohibirlo.

Por ello, la conveniencia de establecer diferentes medidas de seguridad eficientes para lograr proteger al trabajador en forma efectiva. En general, puede llegarse a que en lugar de establecer estándares numéricos máximos se elimine su uso o se sustituya. Por último, se debe legislar, prohibir y, sobre todo, hacer cumplir la ley para proteger la salud y la vida de los trabajadores

REFERENCIAS

- a. Construction Safety Association of Canada, *Construction Safety and Health Manual*, Ontario, 1992.
- b. Comisión de la Comunidad Europea, *Safety and Health in the Construction Sector. Oficina de Publicaciones Oficiales de la Unión Europea*, 1993.
- c. Instituto Finés de Medicina del Trabajo, *Asbestos Program*, 1a. edic., Helsinki, 1992.
- d. OIT, *Recomendación Internacional Núm. 172*.
- e. Ley Federal del Trabajo. *Secretaría del Trabajo y Previsión Social*. México, 1999.
- f. *Ley del Seguro Social*, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, 1999.
- g. "Asbestos on the World", *Hesa Newsletter*, vol. 27, p. 60, E.U., junio de 2005.
- h. Ortega Villalobos, J. Asbestosis. México, 2000. [En línea]. Disponible:<http://www.medspain.com/ant/n13_jun00/ASBESTOSIS.htm>, 19 de septiembre de 2005.
- i. Gutiérrez, A. H. "El amanto: un interrogante abierto", Fueyo Editores [En línea] Madrid, España, 2003. Disponible: <http://www.fueyoeditores.com/RyM_VerNot.asp?R=2&Id=86>, 31 de agosto de 2005.

BIBLIOGRAFÍA:

- Agenda 21*, capítulos 4 y 30. Río de Janeiro, 1992.
- Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, *Polynuclear aromatic compounds, Part 4: Bitumens, coal tras and derived products*, vol. 35, 1985.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR), Asbesto, septiembre de 2003, [En línea] <http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfags/es_tfacts61.html>, 17 de agosto del 2005.
- Alleman, J y Mossman, B., “Reconsideración del amianto” en: *Investigación y Ciencia*, núm. 252, pp. 56-62, Barcelona, España, septiembre de 1997.
- Amianto.net y Analytico Estudios de Amianto S. L., *Asbesto*, Barcelona, España, 2005. [En línea] Disponible: <<http://www.amianto.net/amianto/index.htm>>, 2 de septiembre de 2005.
- Consejería de Trabajo y Formación, *Higiene industrial: El asbesto*, Gobierno de Baleares, España, [En línea]. Disponible: <http://salutlaboral.caib.es/user/amianto_index.es.htm>, 29 de agosto de 2005.
- Declaración de Río*, principios 1, 3 y 15, Río de Janeiro, 1992.
- El ergonomista, *Asbesto*, 2005. [En línea] <<http://www.elergonomista.com/asbesto.htm>>, 30 de septiembre de 2005.
- Environmental Health & Safety. *Asbestos Building Surveys*, 1999, [En línea]. <<http://www.dehs.umn.edu/ishd/asbestos/>>, 20 de julio de 2001.
- Grana, R. et al., *Ecología y calidad de vida*, pp. 86-89, Ed. Espacio, Buenos Aires, Argentina, 1997.
- López Acuña, D. y González de León, D., *La Salud Ambiental en México*, Universo XXI, pp. 63–78, 1991.
- Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales e Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo, *Exposición a fibras de amianto en ambientes interiores*, España, [En línea], Disponible: <http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp_463.htm>, 17 de agosto de 2005.
- Minnesota Pollution Control Agency, *Asbestos in the Home*, [En línea], <http://www.pca.state.mn.us/programs/asbestos_p.html>, 23 de julio de 2001.
- NIOSH, *Occupational Safety and Health Guideline for Asbestos. Potential human carcinogen*, EE.UU., 1988, [En línea], <<http://www.cdc.gov/niosh/pdfs/0041.pdf>>, 10 de agosto de 2005.
- “Occupational Safety & Health Administration”. US Department of Labor, *Better Protection Against Asbestos in the Workplace*, 1993, [En línea], Disponible: 25 de julio de 2001. <<http://www.osha-slc.gov/SLTC/asbestos/index.html>>.
- Página digital, *Las industrias del asbesto cumplen 35 años*, Argentina, 21 de septiembre de 2005, [En línea] Disponible: <<http://www.paginadigital.com.ar/articulos/2005/2005terc/Noticias4/industrias-asbesto-210905.asp>>, 25 de septiembre de 2005.

-Robins, S. L. y Cotran, R. S., *Patología Estructural y Funcional, cap. 12: Patología Ambiental*, 2a. edic., Interamericana España, pp. 487-518, 1984.

-Sandoval Orellana, H. *Salud de los Trabajadores: Asbesto*, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, pp. 1-25, 107-149, 1983.

-Trujillo Sánchez, B. M. y Rosales Aguilera, E., *Determinación de la Norma Técnica de Emisión para Asbesto*, SEDUE, pp. 24-47, 1987.

Enseñanza situada: Crear contextos de aprendizaje de alto nivel de situatividad¹

Gerardo Hernández Rojas
Facultad de Psicología, UNAM
E-mail: gehero@yahoo.com.

[Recibido: Noviembre de 2005. Artículo por Invitación](#)

*El sistema didáctico es un sistema abierto.
Su supervivencia supone su
compatibilización con su medio
(Y. Chevallard)*

CONTEXTO Y RECUENTO

Es para mi un honor comentar el más reciente de los textos publicados por mi amiga Frida Díaz Barriga Arceo, con quien he tenido la oportunidad de compartir varios años de intensas actividades y diálogo académico en la Facultad de Psicología de la UNAM.

Hoy nos sorprende con este nuevo libro titulado *Enseñanza situada: vínculo entre la escuela y la vida*.² Es un texto desafiante para la práctica docente y para el pensamiento psicoeducativo mexicano. Me atrevo a señalar de antemano que será un auténtico hito dentro de su ya sólida y brillante trayectoria académica, en la que se ha distinguido por ir a la vanguardia dentro de la disciplina de la Psicología de la Educación.

La historia de la investigación del proceso de enseñanza y aprendizaje realizado en la disciplina psicoeducativa en los últimos veinticinco años, se ha expresado en diferentes planteamientos que, algunos autores como Shulman (1) o más recientemente Coll y Solé (2) han identificado e intentado describir, los cuales desde mi punto de vista coinciden con el progreso de los estudios e investigaciones realizadas por F. Díaz Barriga, casi en el mismo periodo de tiempo.³ Permítaseme hacer el esfuerzo, estimado lector, para demostrar lo que estoy intentando decir.

En 1979, en pleno periodo de creciente influencia del enfoque cognitivo y luego del “trago amargo conductista”, la Dra. Díaz Barriga realizó su tesis de licenciatura en la que indagó la influencia de las estrategias pre-instruccionales en el aprendizaje significativo de los alumnos, bajo la perspectiva cognitiva de D. P. Ausubel (3). Los frutos de este trabajo influyeron en la formación de los estudiantes de licenciatura en la Facultad, por medio de asignaturas, tesis y materiales didácticos. Esta fue su época de la investigación de la *cognición del alumno*, que también se acompañó de algunos trabajos no menos importantes sobre estrategias de aprendizaje y comprensión lectora.

¹ Una versión preliminar se dió a conocer con motivo de la presentación del texto, celebrado el 6 de diciembre de 2005 en la casa del Libro de la UNAM, Cd. de México.

² Díaz-Barriga, F. *Enseñanza situada: Vínculo entre la escuela y la vida*. México: McGraw-Hill, 2006.

³ Dejo de lado en este breve recuento, los trabajos realizados sobre teoría y diseño curricular que también constituyen una veta importante de su trabajo académico.

Unos años más tarde ya en la década de los ochenta del siglo anterior, cuando retomó fuerza el pensamiento piagetiano en nuestro país, también tuvo su *periodo psicogenético*. Y esto está claramente marcado por dos importantes trabajos seminales.

El primero de ellos fue su tesis de maestría en la que realizó una investigación de corte neopiagetiana sobre el pensamiento formal siguiendo la perspectiva de Siegler (4). En este periodo también escribió algunos importantes trabajos sobre el pensamiento formal y el diseño del currículo y la instrucción en la educación media, así como en torno a la enseñanza de las ciencias, las cuales fueron publicadas en varias revistas educativas reconocidas en el medio (5).

El segundo, a finales de la década de los ochenta, fue producto de la dirección de varios trabajos importantes desarrollados con varios colaboradores en la Facultad, sobre algunas nociones sociales y económicas en el desarrollo del niño (6). Cabe mencionarse que estos trabajos se realizaron por medio de un intenso intercambio de experiencias entre profesores de la UNAM y de la Universidad Autónoma de Madrid, entre los que destacaba Juan Delval. Estos trabajos la condujeron a profundizar en las implicaciones educativas del paradigma psicogenético. Y como fruto de estos años, a inicios de los noventa, desarrolló sus reconocidos trabajos sobre la enseñanza de la historia y de los valores, así como algunas experiencias de formación de profesorado realizadas con profesores de ciclos medios en esta área de conocimiento (7). Por tanto, como ya decía, fue su época de investigación piagetiana, primero con una intención evolutiva y como consecuencia de ello con una perspectiva educativa.

Ya en plena década de los años noventa, nuestra autora decide abordar de lleno el campo de la formación docente y el análisis de las prácticas educativas, yendo más allá de las perspectivas puramente cognitiva y piagetiana de los dos periodos atrás, entrando directamente a abordar en esta nueva problemática los estudios sobre la *cognición de profesor* y la complejidad del *triángulo interactivo didáctico* del aula (la relación ternaria profesor-alumno-saber), desde la perspectiva constructivista de la enseñanza y aprendizaje de C. Coll. Muestra de este nuevo periodo son dos de sus trabajos más recientes.

El primero lo constituye su investigación del doctorado (8), en el que realiza un trabajo novedoso sobre la formación de docentes del área de ciencias sociales (en particular la historia) y en la que ya introduce las ideas de neodeweyanas de Schön sobre la importancia de la reflexión en el quehacer docente y la propuesta de una enseñanza reflexiva. Amén de consignar la importancia del análisis de las prácticas educativas desde una perspectiva constructivista con, desde y para el docente, como un núcleo importante para las acciones de formación del profesorado.

El segundo de ellos, se manifiesta claramente en la primera y segunda edición del texto de "*Estrategias docentes...*" publicado con un servidor (9), en el que se intenta recoger las experiencias previas de interacción continua con el profesorado realizadas a través de diferentes tipos de actividades tales como cursos, seminarios, congresos, etc., y donde se señala la importancia de considerar al docente como un intérprete, un estratega y un agente reflexivo cuando aborda de lleno la cuestión del triángulo interactivo didáctico.

CONTINUIDAD Y DISCONTINUIDAD

Ahora con este nuevo texto que nos ofrece Frida, y que estamos comentando aquí, ¿acaso se abre un nuevo periodo diferente de los anteriores? Me parece que habría que dar una respuesta en parte negativa y en parte afirmativa, dicho de otro modo, simplemente continuidad y discontinuidad.

Digo que una respuesta negativa, porque retoma varias de las ideas ya utilizadas por ella en trabajos anteriores que ya he comentado, a saber: la enseñanza estratégica, la enseñanza reflexiva, la propuesta de Schön sobre el *prácticum* reflexivo y su importancia en la formación de docentes y especialistas disciplinarios, etc.

Pero digo también, que es en parte afirmativa, porque incorpora nuevas ideas para abordar una nueva problemática que reza en el subtítulo de la obra: el vínculo entre la escuela y la vida.

Algunas de las nuevas ideas incorporadas son las del aprendizaje experiencial de Dewey y la idea constructivista social de la cognición situada que se deriva de los trabajos de Brown, Collins y Duguid (10) y Lave y Wenger (11) los cuales están basados en gran medida a partir de una de las interpretaciones del pensamiento vigotskiano y leontieviano.

Para el multifacético Dewey el conocimiento es ante todo experiencia y el enfoque de la enseñanza que se desprende de su propuesta se le conoce como aprendizaje experiencial. Otra de las ideas centrales es el reconocimiento de la actividad reflexiva, que ha inspirado algunas propuestas didácticas de aprendizaje experiencial desarrollados a través de ciclos de reflexión conceptualización-reflexión-integración/prueba. La propuesta de la enseñanza reflexiva, que influyó de manera importante en el diseño curricular y en los programas de formación docente en los noventa, en gran medida es tributaria de estas ideas propuestas por Dewey (12).

Por otro lado, según la perspectiva de la cognición situada, todo proceso cognitivo es social, está situado dentro de contextos y prácticas determinadas y además está distribuido entre los distintos practicantes que participan de dichas prácticas. En la cognición situada se cambia el foco de la cognición individual al escenario sociocultural y a las actividades que las personas realizan dentro de este escenario, de modo que hay una relación mutuamente co-constitutiva entre personas-actividades-contexto. En este sentido, el aprendizaje se entiende como una continua y creciente participación en determinados escenarios, prácticas y comunidades culturales.

Reunir a Dewey con Vigotsky es una inquietud académica que en el imaginario de R. Prawat tuvo lugar en los años veinte del siglo anterior (13), cuestión debatida por cierto. Pero, en el libro de Frida ¡ciertamente ocurre! y se reúnen sus voces, sus miradas y sus propuestas y las implicaciones educativas de sus escritos. En su texto se puede “escuchar” e imaginar el diálogo entre ellos y además se puede dialogar con ellos y con sus seguidores neodeweyanos y neovigotskianos, los que, repensados por la autora, dan pie a la generación de una alternativa teórica-conceptual para abordar la problemática de la relación vida-escuela que nuestra autora también arrebató a la corriente de la escuela nueva en donde es un pilar esencial; cuestión ante todo *deseada* en todas sus diversas variantes pero, que en muchos de ellos, la solución que plantean es a veces un tanto cándida e ingenua.

El debate sobre si realmente la escuela puede o no establecer un continuo con la vida y, por extensión, con el genuino conocimiento científico y con otros escenarios educativos no formales (como los contextos de *apprenticeship*, u otros descritos por Lave, Rogoff, J. S. Brown, etc.) creo que está abierto, y encontramos argumentos a favor y en contra en la literatura psicoeducativa hoy. Considérense aquí, como ejemplos, los argumentos de quienes sostienen la posibilidad de establecer comunidades de aprendizaje dentro o fuera de la escuela lo que implícitamente sostiene la existencia de una continuidad (14) frente a otros trabajos que argumentan la necesidad de reconocer una epistemología propia del contexto escolar *sui generis* diferente de otros escenarios socioculturales (15), o los trabajos sobre el problema de la transposición didáctica que todo sistema didáctico tiene que enfrentar quiérase o no (16), o bien por último, aquellos

que sostienen que todo conocimiento escolar por naturaleza es desencarnado y diferido por llevarlo al currículo y al corazón del escenario escolar.

ENSEÑANZA PARA PROMOVER CONTEXTOS DE APRENDIZAJE DE ALTO NIVEL DE SITUATIVIDAD

En este nuevo texto, me parece que se establece una contribución positiva a ese debate. Y considero que sostiene una propuesta de *vaivén* o interacción entre el triángulo didáctico y el contexto cultural (cotidiano o profesional) que le da sentido y que le influye, buscando establecer vías de conexión. Esto significa, por supuesto, ya no simplemente ver el triángulo interactivo en sí mismo, sino buscar cómo proyectarlo *hacia fuera* en beneficio de aprendizajes más significativos, más reflexivos, más experienciales de los alumnos; en otras palabras, buscar la continuidad entre la escuela y la vida.

En el texto se proponen diversas *macroestrategias* —que pueden emplearse a nivel de propuestas curriculares o como recursos de enseñanza y aprendizaje— para solucionar la problemática de la vinculación de marcos. Ellas son: la enseñanza basada en casos, el aprendizaje basado en problemas y en proyectos, y el llamado *service learning*.

Todas ellas son propuestas que devienen de disciplinas y perspectivas distintas (por ejemplo la enseñanza basada en casos, tiene un origen indiscutible en el campo de la enseñanza de la disciplina jurídica; o bien, no puede negarse la vinculación que tuvo de origen el aprendizaje basado en problemas con el campo de la enseñanza médica) y algunas de ellas desarrolladas originalmente sin un marco teórico-conceptual sólido que les diera sustento (por ejemplo los inicios del aprendizaje basado en problemas). De cualquier modo, en el texto de *Enseñanza situada*, aparecen reconceptualizadas, y el esquema de conjunto que propone la autora, tiene la virtud de proveerles un sentido, de darles una nueva interpretación psicoeducativa, o como diría el filósofo de “ponerlas en pie”.

Otra cuestión que parece indiscutible y que tiene que ver también con esto que acabo de señalar, es que en la propuesta del libro se reúnen algunas tradiciones de investigación ligadas más a la pedagogía con aquellas otras que provienen de la psicología de la educación. Es indiscutible por ejemplo que la influencia de Dewey o la enseñanza basada en proyectos propuesta por Kilpatrick, son propuestas que han sido trabajadas más por los pedagogos que por los psicólogos de la educación. Lo mismo puede decirse, pero en sentido inverso, respecto de la perspectiva de la cognición situada, del aprendizaje cooperativo y del aprendizaje significativo que pertenecen más, sin lugar a dudas, a la disciplina psicoeducativa. En este sentido, celebro ese diálogo disciplinario que la misma formación de la autora ha hecho posible, y nos muestra un camino fecundo que pedagogos y psicólogos educativos podemos seguir construyendo en los años venideros en beneficio de la educación de nuestro país.

¿Pero qué hace parecidas a todas las propuestas de enseñanza situada que se presentan en el texto? A pesar de sus sensibles diferencias tienen algunas características comunes: a) proveen contextos educativos para propiciar aprendizajes de *alta situatividad* en los que se buscan situaciones genuinas o semejantes a las que los alumnos se enfrentan o se enfrentarán en su cotidianidad o en su práctica social, de alta relevancia y pertinencia cultural; b) asimismo, proveen contextos educativos para promover aprendizajes significativos y reflexivos; c) involucran activamente al alumno, de modo que éste consiga un aprendizaje experiencial multidimensional; d) buscan promover la autonomía del alumno; y, e) requieren de situaciones de aprendizaje conjunto alumno–alumno (aprendizaje cooperativo y colaborativo) y enseñante–alumno.

Todas ellas también son tratadas con suficiente lucidez y profundidad no sólo para comprender su sentido y su valor funcional, sino también para ser empleadas con convicción y con sistematicidad, con la firme intención de otorgarle una mayor autonomía y un mayor facultamiento al alumno y para prepararlo para una mejor inserción en la comunidad cotidiana y/o profesional, según sea el caso.

Además, se incluye un capítulo por demás interesante en el que se discute la necesidad de cambiar las prácticas evaluativas si se siguen propuestas didácticas como las que ofrecen las macroestrategias de las que estamos hablando. Se discute la necesidad de plantear una evaluación auténtica, menos artificial y más realista a la que se acostumbra cuando se utilizan instrumentos o técnicas de evaluación de lápiz y papel. Tres tesis son centrales en este capítulo: a) la necesidad de reconocer la vinculación entre los procesos de enseñanza y aprendizaje y los de evaluación, idea que las propuestas de la macroestrategias contienen en sí mismas; b) la necesidad de evaluar aprendizajes auténticos; y, c) reconocer que la meta última de toda practica evaluativa en los escenarios escolares debe ser la autoevaluación.

Festejo en todo lo que vale, esta nueva publicación. Es un nuevo desafío para el pensamiento psicoeducativo mexicano y creo que nos ofrece una serie de planteamientos sólidamente estructurados, que por cierto se presentan en una prosa limpia, de alto nivel académico y que proveen una ayuda ajustada pertinente para el lector por todo el conjunto de recursos didácticos bien pensados y mejor insertados.

Pero lo más importante, retomando a Lotman (17), es que el valor de un texto se redimensiona cuando se analiza su función generadora; es decir, cuando se le ve al texto como un artefacto para pensar y no sólo para reproducir las ideas ahí contenidas.

Porque creo que es un texto para pensar con la autora y con las voces y discursos que ésta retoma y emplea en el interior del texto al construir su discurso y su propuesta.

Creo, convencido también, que este texto nos hará pensar durante un largo rato a los especialistas de la educación porque además de tener “un poco de gracia y otra cosita”, nos abrirá nuevos horizontes para mirar los procesos y las prácticas educativas de una forma alternativa y crítica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Shulman, L., Paradigmas y programas de investigación en el estudio de la enseñanza: una perspectiva contemporánea. En M. Wittrock (Comp.). *La investigación de la enseñanza. Enfoques teoría y métodos*, vol. 1, Barcelona, Paidós, 1989.
2. Coll, C. y Solé, I. Enseñar y aprender en el contexto del aula. En C. Coll, J. Palacios y A. Marchesi (Comps.), *Desarrollo psicológico y educación 2. Psicología de la educación escolar*. Madrid, Alianza, 2001.
3. Díaz Barriga, F. y Lule, M. L. *Efecto de las estrategias pre-instruccionales en alumnos de secundaria de diferentes niveles socioeconómicos*. Tesis de Licenciatura, México, Facultad de Psicología, UNAM, 1979.
4. Díaz Barriga, F. *Inducción de reglas de pensamiento formal en una tarea piagetiana de proporcionalidad: equilibrio de la balanza*, Tesis de Maestría, México: Facultad de Psicología, UNAM., 1984.
5. Díaz Barriga, F. El pensamiento del adolescente y el diseño curricular en educación media superior. *Perfiles educativos*, vol. 37, pp. 16-26, 1987.

6. Díaz Barriga, F., Aguilar, J., Hernández, G., *et al.*, Comprensión de nociones sobre organización social en niños y adolescentes mexicanos de nivel socioeconómico bajo, *Revista de Psicología Social*, vol. 7, núm. 2, pp. 175-193, 1992.
7. Díaz Barriga, F. La adolescencia y algunas implicaciones en la enseñanza de las ciencias sociales, *Perfiles educativos*, vol. 60, pp. 29-34, 1993.
8. Díaz Barriga, F. *El aprendizaje de la Historia en el bachillerato: Procesos de pensamiento y construcción del conocimiento en profesores y estudiantes del CCH/UNAM*, Tesis de Doctorado, México, Facultad de Filosofía y Letras, UNAM, 1998.
9. Díaz Barriga, F. y Hernández, G., *Estrategias docentes para un aprendizaje significativo. Una interpretación constructivista*, México, McGraw-Hill, 2002.
10. Brown, J. S., Collins, A. y Duguid, P., Situated cognition and the culture of learning, *Educational Researcher*, vol. 18, núm. 1, pp. 32-42, 1989.
11. Lave, J. y Wenger, E. *Situated learning*, Cambridge, Cambridge University Press, 1991.
12. Villar, L. M. (Coord.). *Un ciclo de enseñanza reflexiva. Estrategia para el diseño curricular*, Bilbao, Mensajero, 1995.
13. Prawat, R., Dewey meets the “Mozart of Psychology” in Moscow: The untold story. *American Educational Research Journal*, vol. 37, núm. 3, pp. 663-296, 2000.
14. Hernández, G., La zona de desarrollo próximo. Comentarios en torno a su uso en los contextos escolares, *Perfiles Educativos*, vol. XXI, pp. 85-86 & 46-71, 1999.
15. Rodrigo, M. J., Del escenario sociocultural al constructivismo episódico: un viaje al conocimiento escolar de la mano de las teorías implícitas. En M. J. Rodrigo y J. Arnay (Comps.), *La construcción del conocimiento escolar*, Barcelona, Piados, 1997.
16. Chevallard, Y., *La transposición didáctica. Del saber sabio al saber enseñado*. B. Aires, Aique, 1994.
17. Lotman, Y. M., Text within a text. *Soviet Psychology*, vol. 26, núm. 3, pp. 32-51, 1998.

DIRECTORIO ULSA

RECTOR

Mtro. Raúl Valadez García

VICERRECTOR ACADÉMICO

Ing. Edmundo Barrera Monsiváis

VICERRECTOR DE FORMACIÓN

Lic. Martín Rocha Pedrajo

DIRECTOR DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Dr. Ambrosio Luna Salas

COORDINADORA DE INVESTIGACIÓN

Mtra. Esther Vargas Medina

JEFE DEL ÁREA DE EDUCACIÓN Y HUMANIDADES

Mtro. Rafael Ruíz Ramírez

JEFE DEL ÁREA DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA

M. en C. Alejandro Flores Méndez

JEFE DEL ÁREA DE CIENCIAS DE LA SALUD

Dra. Judith del Carmen Pacheco Yépez

INVESTIGADORES

M. en C. Rodolfo Aguilar Escalante
Lic. Verónica Bátiz Alvarez
Dr. Luciano Barp Fontana
Mtra. Lilia Bernal Gracida
Dr. Ohannes Bulbulián Garabedian
M en E.A. Ma. del Consuelo Carranza y Simón
M. en C. Mario Farías Elinos
M. en C. Alejandro Flores Méndez
I.Q. Ma. Concepción Fortes Rivas
Dra. Ma. Bertha Fortoul Ollivier
Dr. José A. García Macías
Dr. Eduardo Gómez Ramírez
M. en C. José Manuel Gómez Soto
Mtra. Alma Rosa Hernández Mondragón
M.I. Rafael Lima Fosado
Fis. Alberto Lima Sánchez
Mtra. Silvia Lozano Gómez Estrella
Mtro. Fernando Martínez Luna
Arq. Bertha Yuriko Silva Bustillos
Dr. Alejandro Mendoza Martínez
Q. Irene Montalvo Velarde
Mtra. Guadalupe Morales Meza
Dr. Marco A. Moreno Armendáriz
Dra. Judith del Carmen Pacheco Yépez
Dr. Francisco Pellicer Graham
Doctor Adrián Rondán Zárate
Mtro. Rafael Ruíz Ramírez
Doctor Oscar Vázquez Tsuji
M.I. Fernando Vera Badillo

CRITERIOS PARA AUTORES

La RCI. Revista del Centro de Investigación Universidad La Salle, es una publicación académica arbitrada con periodicidad semestral y que se difunde a través de la WEB. En ella se publican artículos de investigación y aportes de discusión de diversos contenidos organizados temáticamente. Es un foro plural que posibilita la divulgación de la amplia gama de temas, disciplinas, perspectivas teóricas, enfoques y metodologías cultivados en el campo de la investigación científica, humanística y tecnológica. Una parte de cada número incluye artículos sobre temas específicos — cuyas contribuciones se solicitan por convocatoria —, la otra se mantiene como un espacio abierto para investigaciones recientes de cualquier tema dentro de las áreas del conocimiento cultivadas en la Universidad La Salle: “Educación y Humanidades”, “Ciencias de la Salud”, “Ciencias Naturales y Exactas”, “Ingeniería y Tecnología” y “Ciencias Sociales y Administrativas”.

TIPOS DE CONTRIBUCIÓN

1. Los artículos deben ser originales e inéditos y no someterse (o estar en proceso de respuesta) a consideración simultánea de otra Revista.
2. Los idiomas de la Revista son el español y el inglés, en caso de enviar un artículo en otro idioma deberán incluir un resumen o abstract en los idiomas mencionados.
3. Las colaboraciones que se envíen podrán ser:
 - a) Artículos de investigación (investigaciones empíricas, intervenciones, estudios, desarrollos, estudios evaluativos o diagnósticos). La extensión deberá ser entre 6 y 15 cuartillas.
 - b) Ensayos. (revisiones temáticas, reflexiones sobre diversos fenómenos de interés que contribuyan a la reformulación o conceptualización de un problema, tema o metodología de investigación) que se ubique en el debate actual sobre el tema y manejen una bibliografía pertinente y actualizada, o que valoren resultados de diferentes estudios. Su extensión deberá ser entre 2 y 15 cuartillas.
 - c) Reseñas de libros: máximo 2 cuartillas.

REQUISITOS EDITORIALES

1. Todos los trabajos se someten a dos etapas de dictaminación: a) una primera lectura por parte del Comité Editorial con el objeto de verificar si cubre los requisitos del perfil de la revista, y b) en caso de ser aceptado, se enviará a dos dictaminadores especialistas en el tema.
2. En todo el proceso se conservará el anonimato de árbitros y autores y la adscripción de los primeros será distinta a la del autor.
3. El lapso máximo para dar un dictamen será de tres meses a partir de la fecha en que se emita el comprobante de recepción.
4. La recepción de un trabajo no implica ningún compromiso de la revista para su publicación.
5. Los autores ceden, al aceptarse su artículo, el derecho de su publicación a *la Revista del Centro de Investigación*.
6. Previa petición por escrito al Comité Editorial, se autoriza la reproducción de los trabajos en otros medios, siempre y cuando se garantice que se indicará que fue publicado por primera vez en *la Revista del Centro de Investigación*.
- 7 Los editores se reservan el derecho de hacer las modificaciones de estilo que juzgen pertinentes.
8. Mediante el envío de sus artículos, los autores garantizan la originalidad de sus contenidos y aceptan ceder a La Universidad La Salle los derechos autorales que conforme a la ley les correspondan, autorizando su publicación impresa o electrónica. Los autores podrán reproducir o difundir el o los artículos aceptados con fines académicos y nunca comerciales, pero no publicarlo (s) en ningún otro medio impreso o electrónico, sin el consentimiento expreso del Director de *la Revista del Centro de Investigación*.
8. Los autores son responsables de asegurar el respeto a los derechos de autor o a cualquier tipo de propiedad industrial en el contenido de sus artículos (citas, imágenes, fotografías, etcétera); así como de obtener cuando así se requiera, los permisos o autorizaciones necesarias para la inclusión de hipervínculos (acceso a “sitios vinculados”).
9. La inclusión de anuncios o información comercial sobre productos o servicios está prohibida a menos que sea indispensable para la comprensión del texto o de suma importancia en virtud de criterios estrictamente científicos.
10. Los autores no recibirán remuneración alguna. El envío, aceptación y/o publicación de sus artículos o colaboraciones no producirá relación alguna de ningún tipo con La Universidad La Salle.

PRESENTACIÓN DE ORIGINALES

Artículos

1. Los artículos se entregarán con un márgen de 2.5 cm., en letra Arial de 10 puntos en formato de Word, WordPerfect, (plataforma PC o Macintosh) y podrán ser enviados en disquete de 31/2 o bien a través de correo electrónico a <revista@ci.ulsamx.>
2. Los trabajos deberán enviarse con atención al coordinador responsable de cada número. (ver Convocatoria)
3. Una página estándar en tamaño carta debe incluir en promedio 350 palabras.
4. Deberá incluirse un resumen en castellano y en Inglés, no mayor de 130 palabras, así como cinco palabras clave.
5. Deberán enviarse, por separado, los originales de cuadros y gráficas, anotando dentro del texto su ubicación.
6. Las notas deberán incluirse al final del trabajo, antes de bibliografía y debidamente numeradas.
7. Dentro del texto, las referencias bibliográficas se presentarán en forma numérica.
8. Deberá, asimismo, incluirse el nombre del autor, adscripción y cargo que desempeña, dirección institucional, teléfono y fax de su oficina así como correo electrónico.
9. En el caso de Figuras se señalarán mediante una anotación en la parte inferior de la misma en itálicas. Y en el caso de Tablas se señalarán mediante una anotación en la parte superior de la misma en itálicas.
10. Respecto a las imágenes que se necesiten, deberán utilizar algún formato que sea editable dentro de Windows o Macintosh. Archivos creados en WinWord, Excel, Photoshop, Illustrator, Free Hand, convertidos o salvados formato gif o jpg.
11. Los autores deberán incluir un resumen curricular de aproximadamente 1 cuartilla, que contenga estudios que se tienen y en dónde se realizaron, obras y trabajos publicados, actividades relevantes, logros sobresalientes y cargos desempeñados.
12. Referencias
Para las referencias se utilizará el sistema numérico.
Para la anotación de las referencias se utilizará el siguiente formato:

Revistas

Número de referencia. Apellido, iniciales del nombre(s) de cada autor, no más de 3. En caso de que pase este número de autores se pondrá el apellido e iniciales del primer autor y se agregará et al., título del artículo entre comillas, título de la revista en itálicas, lugar, volumen(vol.), número (núm.), página(s) (p. o pp.), año (completo). Separar con comas cada categoría.

Ejemplo:

- (1) Pérez, J. L., "La cibernética moderna", *Física*, México, vol. XXIV, pp. 34-37, 1997.
- (2) López, J.P., Sánchez, A., Ibarguengoitia, E., "El microchip", *Cibernética actual*, México, vol. IV, núm. 25, p. 67, 1997.

Libros

Número de referencia. Apellido, iniciales del nombre(s) de cada autor, no más de 3. En caso de que pase este número de autores se pondrá el apellido e iniciales del primer autor y se agregará et al. Título del libro en itálicas, volumen (vol.) -en caso de haberlo-, edición o reimpresión, lugar, editorial, página(s) (p. o pp.) año (completo). Separar con comas cada categoría.

Ejemplo:

- (1) Alcocer, A., *De química y otras ciencias*, 4a.ed., Barcelona, Editorial Tecnos, pp. 57-78, 1996.

En caso de citar al mismo autor inmediatamente se empleará: *Ibidem* o *Ibid*.

Ejemplo: *Ibidem*,
Ibid, p. 59.

En caso de citar subsecuentemente la misma obra pero no inmediatamente sino después de otras obras, se escribirá así: el primer apellido del autor, op. cit., página(s).

Ejemplo: Alcocer, op.cit., p.60.

Notas

Para los artículos que lleven notas, éstas deberán incluirse al final del artículo.

Revistas

Las notas de revistas deberán incluir: Autor con apellido(s) y nombre(s), título del artículo entre comillas, título de la revista en itálicas, lugar, volumen (vol.), número (núm.), página(s) (p. o pp.) y año (completo).

Las notas de libros

Apellido, iniciales del nombre(s) de cada autor, no más de 3. En caso de que pase este número de autores se pondrá el apellido e iniciales del primer autor y se agregará et al. Título del libro en itálicas, volumen (vol.) -en caso de haberlo-, edición o reimpresión, lugar, editorial, página(s) (p. o pp.) año (completo). Separar con comas cada categoría.

Fuentes electrónicas

En el caso de utilizar fuentes electrónicas se debe cuidar en forma estricta la veracidad y confiabilidad de la misma, así como el respaldo auditado de instituciones o autores de prestigio. Y se aconseja evitar el abuso de estas citas.

Al citar un documento que se encuentre en Internet se debe incluir : Autor, título del documento, fecha de creación, o de última revisión, dirección electrónica subrayada, fecha de consulta. Se debe especificar que se obtuvo en línea (se pone entre corchetes [En Línea]) y la dirección electrónica así como la fecha en que se obtuvo el documento. Sígase la siguiente estructura:

Autor, título del documento, fecha de creación o de última revisión. [En línea] Disponible [http:// dirección/nombre del archivo](http://dirección/nombre del archivo), fecha de obtención del documento.

Ejemplo:

(1) Rodríguez, David. Cómo se originan algunas enfermedades. Octubre de 1997. [En línea] Disponible: <<http://www.main.conacyt.mx/dcct/como.html>> 22 de febrero de 1998.

ó

(1) Dávila, Alma. Una clase de Física Elemental [En línea]

Disponible:

<<http://www.nalejandria.com/00/estudio/clase1/index.htm>> 2 de mayo de 1998.

En el caso de las direcciones para enviar correo electrónico, éstas se anotarán entre corchetes, de la siguiente manera:

<revista@ci.ulsamx>

Notas y bibliografía: irán al final del artículo, ordenadas numéricamente. En caso de Fuentes electrónicas, indicar fecha de consulta. Para mayor precisión, se recomienda seguir el estandar ISO 690:1987 e ISO 690-2:1997.

13. Ecuaciones y referencias

Para la inserción de ecuaciones y sus referencias se debe poner entre corchetes cuadrados el número de ecuación agregando la abreviatura Ec.

Ejemplos:

...considere un sistema descrito por

$$c = f(x,t, m), \quad [\text{Ec.1}]$$

donde x e t es el estado...utilizando la Ec. 1.

...sin embargo, existen algunas técnicas desarrolladas en (Ec. 1) para la reconstrucción de atractores...

RESEÑAS DE LIBROS

Para las reseñas de libros es recomendable citar al autor con sus datos biográficos básicos; ocuparse no sólo del libro sino también del asunto que trata -circunscribirlo-; identificar el propósito del autor, lo que pretende demostrar, sus contribuciones; determinar las fuentes, su manejo, metodología, organización de resultados, estructura del libro. Ficha técnica del libro (Véase Bibliografía)

REVISIONES TEMÁTICAS Y ENSAYOS

Las revisiones temáticas deberán contener la información requerida, fundamentada con la bibliografía que la apoye y debe de tener un aparato crítico sólido y sustentable.

BIBLIOGRAFÍA

Al final del artículo se agregará, la bibliografía alfabética que sirva de soporte al texto. En la Bibliografía se deberá incluir los siguientes datos:

Revistas

Autor(es), título del artículo entre comillas, título de la revista en itálicas, lugar, volumen (vol.), número (núm.), país, página(s) (p. o pp.) y año (completo).

Libros

Autor(es), título del libro en itálicas, volumen (vol.), edición, lugar, editorial, página(s) (p. o pp.) y año (completo).

Para asuntos editoriales, dirigirse a:

D.G. Saracely Gómez Ballesteros

RCI. Revista del Centro de Investigación

E-mail: sgomez@ci.ulsal.mx

Tel.: 5278-9500. Ext. 2388

Para asuntos académicos:

Coordinador de la sección temática de cada número (ver convocatorias) ó

Mtra. Esther Vargas Medina

Directora de la Revista

E-mail: revista@ci.ulsal.mx

Tel.: 5278-9500. Ext. 2386, 2387, 2388

