

Actas de Informes de Pasantía de la Licenciatura en Biología Humana

Primera Edición, 2011



Licenciatura en
Biología Humana



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

Universidad de la República

*Actas de Informes de Pasantía de la
Licenciatura en Biología Humana*

COMPILADO DE INFORMES DE PASANTÍA
APROBADOS ENTRE 2009 Y JUNIO DEL 2011

Este documento es el resultado de la compilación de los Informes de Pasantía de fin de carrera aprobados de los egresados de la Licenciatura en Biología Humana entre enero de 2009 y junio del 2011. Se reservan los derechos de autoría y se autorizan las reproducciones y traducciones siempre que se cite la fuente. Queda prohibido todo uso de esta obra, de sus reproducciones o de sus traducciones con fines comerciales.

Primera edición: Octubre 2011.

Edición y diseño: Unidad Académica de la LBH.

Tabla de Contenidos

- 1 Germán Botto - “Detección de anticuerpos antirrábicos en quirópteros del Uruguay: un aporte para la Vigilancia Epidemiológica de Rabia Silvestre”.
- 2 Analia Ciganda - “Análisis de ADN antiguo muy degradado de restos óseos humanos hallados en el territorio uruguayo”.
- 3 Gianni Curti - “Estudio del daño del ADN espermático en pacientes infértiles”.
- 4 Nicolás Estrada - “Identificación de las mutaciones *2 y *3 del gen CYP2C9”.
- 5 Paula González - “Introducción a la Biomecánica Humana con perfil clínico y deportivo”.
- 6 Diego Lombardo - “Papel de las conductancias de potasio en la homeostasis dendrítica y su posible papel en la patología Humana”.
- 7 Jimena Mas de Ayala - “Estudio morfofuncional de la vagina en animales prepúberes y adultos con autoinjerto heterotópico de ovario, con diferentes períodos postinjerto”.
- 8 Natalia Pi - “ Efecto del Factor de Necrosis Tumoral alfa en la expresión de diferentes proteínas involucradas en la señalización por Ca²⁺ en el Miometrio Humano”.
- 9 Marcela Piffaretti - “Tiempo de procesamiento de la información visual semántica en seres humanos”.
- 10 Sergio Podestá - “Modulación de la latencia de la percepción visual. Estudio psicofísico”.
- 11 Camila Zugarramurdi - “Selectividad y permeabilidad de la Na/K ATPasa -Influjo desacoplado de cationes-“.



UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
URUGUAY

INFORME DE PASANTÍA

Licenciatura en Biología Humana
Perfil Epidemiología

Detección de anticuerpos antirrábicos en quirópteros del Uruguay: un aporte para la Vigilancia Epidemiológica de Rabia Silvestre

Br. Germán Botto Nuñez

Tutor

Prof. Dr. Juan R. Arbiza

Sección Virología
Facultad de Ciencias UdelaR

Co-orientador

Lic. Eduardo Reolón

Sector Virología
Laboratorios Santa Elena S.A.

*(...) Y a la puerta de la ciencia, como a la del
infierno, debiera estamparse esta consigna:*

*Qui si convien lasciare ogni sospetto;
Ogni viltá convien che qui sia morta*.*

Karl Marx.

Critica a la Economía Política. 1859

* “Déjese aquí cuanto sea recelo, Mátese aquí cuanto sea vileza”. Dante, La Divina Comedia.

Agradecimientos

A mi tutor, el Dr. Juan Arbiza por el constante apoyo y aliento a mi interés por las zoonosis emergentes y por permitirme desarrollar esta idea aún cuando hablar de rabia en murciélagos en Uruguay tenía cierto matiz de ciencia ficción.

Al Laboratorio Santa Elena S.A. por creer en este trabajo y brindarme la posibilidad de realizar el trabajo de laboratorio en sus instalaciones. Al Lic. Eduardo Reolón por introducirme en los aspectos prácticos de virología y aportarme su experiencia en este campo. Al personal de la empresa y muy especialmente a los compañeros de Virología, por el inestimable apoyo que me brindaron durante la realización de la pasantía.

Al Dr. Noël Tordo de la Unidad de Biología de enfermedades virales emergentes del Institut Pasteur de Lyon por el importante asesoramiento y apoyo durante la puesta a punto del RFFIT.

Al Museo Nacional de Historia Natural y Antropología que oficio de marco para la creación y funcionamiento del Grupo de Investigación y Conservación de los Murciélagos de Uruguay. Al director del MUNHINA Lic. Arturo Toscano, por brindar el respaldo institucional, apoyar y respetar las tareas desarrolladas por el GIM respecto de la Rabia.

A la Dra. Helena Guarino (Facultad de Veterinaria, DILAVE / MGAP), otra de las pocas personas que creían en la necesidad de trabajar en el vínculo de los murciélagos y la rabia en Uruguay, aún antes de que esta surgiera; por darme un lugar el trabajo desarrollado en la Facultad de Veterinaria sobre vigilancia de la rabia urbana en quirópteros.

A la Ing. Agr. Angelita Gómez (RENARE / MGAP), por darme la posibilidad de participar en las campañas de investigación y control del Brote de rabia paralítica en el norte del País a fines de 2007, brindándome la posibilidad de conocer de cerca la enfermedad.

A Enrique González y Alby García-López por introducirme en el estudio de los mamíferos y especialmente de los murciélagos y colaborar en mi aprendizaje de la mastozoología de campo.

A Ana Laura Rodales y demás integrantes del GIM y colaboradores ocasionales por toda la colaboración en las salidas de campo, la prueba de los métodos de manipulación, la experiencia aportada, la ayuda en toma de muestras y por estar ahí cuando precisé de ellos.

Al Departamento de Medicina Preventiva y Social de la Facultad de Medicina, su director Prof. Dr. Alejandro Gherardi y los docentes Dra. Mariana Gómez, Dr. Claudio Sosa, Dr. Wilson Benia, Dra. Alicia Aleman y Dra. Adriana Misa, por ayudarme en la formación en Epidemiología, permitiéndome realizar los cursos de postgrado de la especialidad que dicta esa cátedra a pesar de provenir de una formación totalmente diferente, y por el apoyo en aquellos momentos en que mi falta de formación clínica se hizo evidente y muy especialmente por apoyar este proyecto de carrera atípica.

A la Dra. Mónica Capovilla por la ayuda brindada para mejorar la técnica de sangrado y maximizar los volúmenes en las primeras extracciones de sangre de los murciélagos

A la Mag. Viviana Sánchez, del servicio de microscopia de epifluorescencia del Institut Pasteur de Montevideo por la ayuda en la toma de las micrografías de fluorescencia para la presentación del avance de este trabajo en las IX Jornadas de Zoología del Uruguay.

A toda mi familia, y especialmente a mi novia por soportar durante seis años los cambios de carrera, las interminables sumas restas y multiplicaciones de horas y créditos, varios murciélagos en los freezers, las salidas de campo, las redes de niebla, las disecciones, las horas en el museo, las horas en el laboratorio, la atención constante a los murciélagos volando en la noche y demás consecuencias desagradables (para los que nos rodean) derivadas de esta vocación.

No se trata de la salud de la Vida Silvestre, o del Hombre o del Ganado. Realmente hay una sola salud: la salud y el equilibrio de los ecosistemas.

Dr. William Karesh[†]

Wildlife Conservation Society

[†] Citado por David Quammen en "Contacto Letal". National Geographic en Español 24(6):3-29. Junio de 2009.

Índice

1. Resumen – Abstract	7
2. Introducción	8
3. Objetivos	
3.1. Objetivo general	12
3.2. Objetivos específicos	12
4. Material y métodos	
4.1. Cultivos celulares y virales	13
4.2. Producción de sueros control	14
4.3. RFFIT	14
4.4. Captura e identificación de los ejemplares	15
4.5. Toma de datos y muestras biológicas	17
4.6. Conservación de las muestras	18
5. Resultados	
5.1. Cultivos celulares, virus y sueros control	19
5.2. Testeo de los sueros	20
6. Discusión	23
7. Conclusiones y perspectivas	26
8. Bibliografía	27
9. Anexos	
9.1. Anexo 1. Procedimiento Operativo Estandar: Detección de anticuerpos antirrábicos mediante Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test	30
9.2. Anexo 2. Clave de campo para la determinación de las especies de molósid (Mammalia: Chiroptera) de Uruguay en base a caracteres externos (visibles sin realizar incisiones)	32
9.3. Anexo 3. Hoja del catálogo detallado de campo.	33

1. Resumen

La rabia es una enfermedad viral que puede afectar a todos los mamíferos. A nivel regional y mundial, los reservorios silvestres toman cada vez más importancia en la transmisión de esta enfermedad, conforme se controlan los ciclos urbanos y se agudizan los impactos antrópicos en los ambientes naturales. La vigilancia epidemiológica es una herramienta indispensable para el control de la enfermedad. Las técnicas laboratoriales aplicadas a Rabia son muy diversas. La serología es una buena herramienta para la investigación epidemiológica especialmente en animales silvestres. En este trabajo se analizaron sueros de campo de animales silvestres, testando un protocolo aplicable para la vigilancia de la circulación del virus en murciélagos. La técnica utilizada fue la prueba de inhibición de focos fluorescentes (RFFIT por sus siglas en inglés: Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test) la cual es una técnica rápida, barata y confiable, apropiada tanto para vigilancia epidemiológica, como para la evaluación de la respuesta a la vacunación. Esta técnica fue puesta punto durante este trabajo, modificándola para adaptarla a las condiciones de trabajo y recursos de un laboratorio local; y se produjeron sueros control para los ensayos. Los resultados obtenidos constituyen, a nuestro entender, la primera evidencia de anticuerpos neutralizantes en sueros de quirópteros y carnívoros de Uruguay: tres *Desmodus rotundus* y un *Cerdocyon thous*. La presencia de anticuerpos indica la exposición al virus, a pesar de que las muestras de *D. rotundus* provenían de una localidad que se mantuvo sin casos confirmados de rabia.

Palabras clave: Serología; Vigilancia epidemiológica; Rabia; Murciélagos; *Desmodus rotundus*; *Cerdocyon thous*.

Abstract

Rabies is a viral disease that could affect to all mammal species. At regional and world level, wild reservoirs became more important as urban cycles are controlled and human impacts on natural environments increases. Epidemiologic surveillance is an important tool for disease control. Laboratory techniques in rabies are very diverse. Serology is a suitable instrument for epidemiological research specially in wild fauna. In this work field sera samples from wild animals were analyzed, testing a standard procedure suitable for viral circulation surveillance in bats. The technique employed was the Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) which is a quick, affordable and reliable test, suitable both for epidemiologic surveillance and for control of vaccination response. This technique was modified and set-up during this work to fit the working conditions of a local laboratory. Control sera for the assay were produced as well. Three *Desmodus rotundus* and a *Cerdocyon thous* were founded positive. This results are, to our knowledge, the first evidence of neutralizing antibodies in wild bats and carnivore sera from Uruguay. The presence of antibodies shows a history of exposition to virus, although the *D. rotundus* samples were from a site without livestock rabies cases

Key words: Serology; Epidemiologic surveillance; Rabies; Bats; *Desmodus rotundus*; *Cerdocyon thous*.

2. Introducción

La rabia es una enfermedad aguda del sistema nervioso que puede afectar a todos los mamíferos. Esta enfermedad se adquiere en general a través de la mordida de un animal infectado, pero también puede contraerse por el contacto con aerosoles que contienen el virus (Corey, 1998).

La infección por el virus de la rabia produce de 40.000 a 100.000 muertes anuales en todo el mundo, además de los millones de personas que deben ser sometidas a costosos tratamientos post-exposición, especialmente en los países en desarrollo de las regiones tropical y subtropical (Ruprecht *et al.* 1995). La epidemiología de esta enfermedad ha variado sustancialmente en las últimas décadas: entre el 70% y el 80% de los casos humanos ocurridos en los Estados Unidos desde 1946 a 1965, se relacionaban a una exposición conocida al virus, principalmente mordidas de perros; sin embargo el 80 % de los casos ocurridos a fines de los años 80 y comienzos de los 90, no contaban con un historial de exposición conocido (Ruprecht *et al.* 1995). Además, tanto en los Estados Unidos, como en otras partes del Mundo incluida América Latina, la fuente principal de infección ha cambiado, pasando de ser de los perros domésticos, a una situación en la que la fauna silvestre y particularmente los murciélagos juegan un rol preponderante (Ruprecht *et al.* 1995; Schneider, 1995; Schneider *et al.*, 1996; Favi *et al.*, 1999; Favi *et al.*, 2002). Este cambio en la importancia relativa de los distintos reservorios animales para la ocurrencia de casos humanos, debe ser interpretado a la luz de dos sucesos importantes: en primer lugar el éxito de las campañas de combate a la rabia humana, y en segundo, al cambio en patrones de uso del espacio y de los recursos que ha experimentado la fauna silvestre en relación a los cambios en el uso del paisaje realizado por la población humana (Schneider, 1995; Schneider *et al.*, 1996; Favi *et al.*, 1999; Amasino *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2005).

En Uruguay la rabia pudo haber ingresado a través de perros infectados provenientes de Inglaterra o África durante las invasiones inglesas al Río de la Plata a comienzos del siglo XIX, registrándose casos a partir de 1807 en la entonces Banda Oriental (Amasino *et al.* 2002). Se registraron en el país varios brotes epizooticos durante el siglo XX: en 1927 y 1937 y mas tarde entre los años 1965 y 1966. Entre 1949 y 1964 no se reportaron casos de rabia canina,

reportándose en éste último año un caso de rabia humana previo al registro de la última epizootia (Tosi *et al.* 1968). El último registro de rabia humana corresponde al año 1966, totalizando tan solo diez casos en el siglo XX (siete entre 1918 y 1937 y los últimos tres entre 1965 y 1966) (Tosi *et al.* 1968; Salvatella, 2002). El último caso registrado en caninos corresponde a un perro del departamento de Rocha en el año 1985 (Salvatella, 2002).

En octubre de 2007 se confirmó el primer caso de rabia parálitica bovina en el país (CONHASA, 2007). Los casos anteriores registrados en ganado fueron atribuidos a rabia canina (Salvatella, 2002). Estos nuevos casos detectados a partir de octubre de 2007 implican la reemergencia de la enfermedad luego de 22 años de silencio epidemiológico, pero al mismo tiempo implican la emergencia de una forma clínica y epidemiológica diferente a la rabia urbana conocida en Uruguay. A partir del brote y de las acciones de control de mismo emprendidas por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) se constató la presencia de ejemplares infectados de *Desmodus rotundus* confirmándose esta especie como origen del brote. A la fecha, se han identificado 52 focos (Departamentos de Rivera y Tacuarembó) en todo el país, de los cuales 11 se encuentran aún activos (Dpto. Rivera); se identificaron 3 colonias de *D. rotundus* positivas y actualmente se han detectado focos en Brasil cercanos a la frontera con Uruguay en la zona de Paso Centurión (CONHASA, 2007; CONHASA, 2008²). Las acciones de vigilancia llevadas adelante en el país, lograron identificar tres especies de murciélagos no hematófagos positivas para el virus: *Tadarida brasiliensis* (Dpto. Rivera y Montevideo), *Myotis sp.* (Dpto. Tacuarembó) y *Molossus molossus* (Dpto. Montevideo), además de los casos positivos de *D. rotundus* principalmente en Rivera y el norte de Tacuarembó (Guarino *et al.*, 2008¹; Guarino *et al.* 2008²).

La presencia de anticuerpos en el suero de un individuo (seropositividad), indica contacto con el agente infeccioso aunque no es determinante de enfermedad. Por lo tanto la serología puede utilizarse en investigación pero no tiene valor diagnóstico ni en humanos ni en animales. Sin perjuicio de esto último, la rapidez y relativamente baja invasividad que implican las pruebas serológicas, las convierten en elementos útiles en el campo de la epidemiología. La serología puede ser utilizada para seguir la respuesta inmune inducida por la vacunación tanto en animales (domésticos o silvestres)

como en seres humanos. En fauna silvestre sirve a la vez para evidenciar la circulación viral, y permite evaluar la inmunidad de las poblaciones al virus, lo que puede ser utilizado como indicador del riesgo de aparición de un brote.

Existen numerosos métodos para revelar la presencia de anticuerpos en una muestra de suero. La seroneutralización, una prueba que consiste en infectar un cultivo celular o un animal de experimentación con una cantidad constante y conocida de virus y diluciones seriadas del suero a testar, presenta la ventaja de permitir detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero por la inhibición de la infección que estos provocan. Así mismo esta técnica permite cuantificar los anticuerpos presentes en la muestra incluyendo en la prueba diluciones seriadas de una muestra de suero cuya concentración de anticuerpos es conocida (suero de referencia).

La prueba de inhibición de focos fluorescentes (RFFIT por sus siglas en inglés: Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test) (Smith *et al.*, 1996) permite la detección de anticuerpos neutralizantes. Para la realización de esta prueba se incuba una cantidad constante y conocida de virus de rabia con diluciones de las muestras de suero, luego de un periodo de incubación, se infecta con la muestra un cultivo celular. El virus no neutralizado provocará una infección en la monocapa que puede ser visualizada mediante la tinción con anticuerpos fluorescentes y la observación bajo microscopio de epifluorescencia. La inhibición se determina por comparación con un suero control sin anticuerpos neutralizantes. El resultado obtenido es en principio cualitativo, expresándose el título como el inverso de la dilución mas baja que inhibe el 50% de los focos en comparación con el control negativo. Cuando se requiere un resultado cuantitativo, el título de anticuerpos neutralizantes en la muestra se obtiene por comparación con un suero estándar previamente calibrado, para esto se utiliza en general un suero estándar internacional; en este caso se obtiene un título en unidades internacionales por mililitro (UI/ml).

Otro factor importante en la correcta determinación del papel que juegan las diferentes especies en los ciclos de la enfermedad, es la correcta identificación taxonómica de los ejemplares. Las técnicas convencionales de diagnóstico posmortem para rabia, implican extracción del cerebro, dañando caracteres taxonómicamente valiosos a nivel del cráneo (Sheeler-Gordon & Smith, 2001). En este sentido la utilización de técnicas de diagnóstico que preserven estos

caracteres y la coordinación entre las tareas de vigilancia epidemiológica y de identificación taxonómica y conservación de los ejemplares, surge como una imperiosa necesidad.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue la detección de anticuerpos antirrábicos en sueros de quirópteros con potencial aplicación en vigilancia epidemiológica de la rabia en Uruguay.

3.2. Objetivos específicos

- Puesta a punto de la técnica de inhibición de focos fluorescentes (RFFIT) realizando modificaciones de la técnica original para adaptarla a las condiciones de trabajo de un laboratorio local.

- Producir un suero hiperinmune antirrábico para ser usado como control en la técnica.

- Probar la viabilidad de la técnica para ser utilizada en relevamientos serológicos en fauna silvestre en el país.

- Redactar un protocolo estándar para la realización de la prueba en diferentes especies silvestres.

4. Material y Métodos

4.1. Cultivos celulares y virales

Se utilizaron células de la línea BHK-85 provenientes del instituto TECPAR de Brasil conservadas en nitrógeno líquido. Se realizaron varios ensayos para determinar el medio óptimo para el crecimiento de estas células.

El descongelado de las células se realizó en 10 cc de medio mínimo suplementado al 10% de suero fetal bovino (MEM 10% SFB). Luego de una hora de adhesión se renueva el medio para eliminar los restos de crioconservante (DMSO) tóxico para el crecimiento de las células. El cultivo se continúa 48 horas, hasta que la monocapa alcanza un 100% de confluencia. Los subcultivos se realizaron ajustando a 2.5×10^5 células/ml.

Se realizaron dos cultivos en paralelo utilizando diferentes medios, de manera de evaluar las condiciones ideales de cultivo para las células. El primer cultivo continuó utilizando el MEM 10% SFB suplementado con glucosa a una concentración final de 4.5 g/l, en el otro se utilizó el Glasgow's MEM también suplementado con SFB al 10% (GMEM 10% SFB).

Como inóculo se utilizaron dos lotes de virus cepa PV (Pasteur Virus), producidos en biorreactores para obtención del antígeno para la vacuna. Los virus utilizados fueron extraídos del tanque de producción previo a la inactivación y titulados por Dosis Formadora de Focos Fluorescentes 50% [FFD₅₀] (Smith et al. 1996) y por Dosis Letales 50% [LD₅₀] en animales de experimentación según los procedimientos estándar para control de calidad de los antígenos para producción de vacunas animales. Se utilizaron los lotes 810807 y 810808.

Se realizaron dos protocolos alternativos para la titulación por focos fluorescentes: en el primer protocolo, se siembran 400µl de una suspensión de células cuya concentración se ajustó a 2.0×10^5 cel/ml utilizando un medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino al 10%, transcurridas 24 horas de cultivo se descarta el medio y se realiza la infección con un inóculo de 200µl de virus en diluciones seriadas en base 10 (de 10^0 a 10^{-6}), se deja adsorber durante 1 hora y luego se completa el medio con 500µl de MEM 2% SFB. En el segundo protocolo utilizado, se siembran 200µl de cada dilución (10^0 a 10^{-6}) del virus al mismo tiempo que las células (400µl, 2.5×10^5 cel/ml) en las placas. En

ambos casos, luego de transcurridas 20 horas de la infección se descarta el medio de las cámaras en una solución virucida de hipoclorito de sodio y se tiñen las placas mediante la técnica de inmunofluorescencia directa.

El título viral se calculó como el logaritmo en base diez del recíproco de la dilución que presentaba la tasa de campos infectados (acumulada) inmediatamente inferior a 50% ("starting-point dilution") menos la diferencia de logaritmos (Smith *et al.*, 1996).

4.2. Producción de sueros control

Como controles se utilizaron sueros de cobayo (*Cavia porcellus*): como control negativo se utilizó el suero de un cobayo virgen, sin historia de inmunización ni exposición al virus. Como control positivo se utilizó el suero de un cobayo inmunizado utilizando la vacuna RabatVac (Lote 004) formulada para pequeñas mascotas, producida por el Laboratorio Santa Elena. La inmunización se realizó en tres dosis de 1ml subcutáneo a los días 0; 8 y 35, y se realizaron dos sangrados por punción cardiaca a los días 15 y 51 extrayéndose 5 ml cada vez. Tanto para el control positivo como para el negativo, luego de la extracción de la sangre, se dejó separar el suero a 37° durante 1 hora y luego se centrifugó la muestra a 2500 RPM durante 12 minutos. El suero extraído fue inactivado por calor en baño maria a 56°C durante 30 minutos, fraccionado en alícuotas de 100µl y conservado a -70°C.

Ambos sueros control fueron testados para determinar si eran capaces de inhibir la infección. Se realizó una titulación por RFFIT del suero control positivo para determinar la dilución final en la que se veía inhibición de la infección. Para esto se realizó una titulación cualitativa del suero por inhibición (RFFIT) utilizando diluciones seriadas en base dos: 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80. En la misma prueba se incluyó una muestra del suero control negativo en dilución 1:5, un pocillo de control del cultivo celular (sin virus ni suero) y un pocillo de control del virus (sin suero).

4.3. RFFIT.

La técnica de RFFIT se desarrolló según lo descrito por Smith (1996), realizándose modificaciones en la línea celular y la cepa viral utilizadas. Se confeccionó un protocolo incluyendo las modificaciones realizadas, que fue

redactado según normas Good Manufacturing Practices (GMP) para laboratorios de diagnóstico, describiéndose en un Procedimiento Operativo Estandar (POE), aprobado y conservado en el Departamento de Aseguramiento de la Calidad del Laboratorio Santa Elena S.A. (Anexo 1).

Los ensayos se realizaron utilizando Cell Culture Chamber-slides de cuatro pocillos. Brevemente, el protocolo consiste en incubar durante una hora el suero a testar (dilución 1:5; 200 µl) con un inóculo de virus (Lote 810808; 200 µl; $5.0 \times 10^{1.53}$ FFD₅₀/ml) durante una hora. Transcurrido ese tiempo se agregan 400 µl de una suspensión de células BHK monocapa (2.5×10^5 cel/ml) y se cultiva durante 20 hrs. (37° C; 5% CO₂).

Para cada ensayo se incluye una Chamber-slide de cuatro pocillos como control, en la misma se siembran las siguientes muestras:

- Pocillo 1: Control de células. 400 µl de MEM + 400 µl suspensión de células.
- Pocillo 2: Control de virus. 200 µl de MEM + 200 µl inóculo virus + 400 µl suspensión de células.
- Pocillo 3: Suero control negativo. 200 µl de suero cobayo virgen (dilución 1:5) + 200 µl inóculo virus + 400 µl suspensión de células.
- Pocillo 4: Suero control positivo. 200 µl de suero cobayo vacunado (3^a dosis, segunda extracción; dilución 1:5) + 200 µl inóculo virus + 400 µl suspensión de células.

Luego de concluir el cultivo, la fijación de las células se realizó por inmersión en acetona fría (-20° C) durante 30 minutos y se realizó tinción para inmunofluorescencia directa utilizando un anticuerpo antirrábico conjugado con FITC (Fluorescein isothiocyanate) VMRD (endpoint 1:8), se realizaron dos lavados con PBS pH 7.0 y la lámina se montó con cubreobjeto utilizando glicerina bufferada (Glicerina/PBS 50%). La observación se realizó a un aumento de 400x.

4.4. Captura e identificación de los ejemplares

Las muestras utilizadas fueron tomadas de quirópteros capturados en el marco de actividades de campo de la sección mamíferos del MUNHINA y del GIM entre setiembre y diciembre de 2007. Para la captura se utilizaron redes de



Figura 1. Localidades de colecta de los ejemplares analizados.

niebla colocadas bien, a la entrada de los sitios identificados como refugios, o bien en zonas de posible pasaje de los animales durante el vuelo (cursos o espejos de agua y sus márgenes, bordes de monte lineal, sobre alambrados en campos de pastoreo). Las redes fueron colocadas alrededor dos horas previo a la puesta del sol y son revisadas periódicamente a intervalos que dependen de la actividad registrada pero que nunca son mayores a 3 horas. Los ejemplares fueron retirados de las redes utilizando guantes de cuero y luego colocados en bolsas de tela oscura hasta el momento de su procesamiento. Para la identificación de los ejemplares en el campo, se siguió la clave propuesta por González (2001) en el caso de las familias Vespertilinidae y Phyllostomidae; para la familia Molossidae se construyó una clave alternativa en base a caracteres externos (Anexo 2) a partir de la propuesta por González (2001) y datos originales del autor y otros publicados por Barquez *et al.* (1999). Luego del ingreso del animal a la colección del MUNHINA, la identificación pudo ser corroborada mediante la verificación de caracteres craneales y otros. Adicionalmente se tomó una muestra de un zorro de monte (*Cerdocyon thous*)

encontrado atropellado durante una salida de campo, sobre un camino vecinal en la zona de la forestal FYMNSA al oeste de Ruta 5 (km. 452) (Figura 1).

4.5. Toma de datos y muestras biológicas

Por cada animal colectado se completó una ficha del catálogo de campo detallado (Anexo 3), asignándosele un número de campo para luego ser ingresado a la colección de mamíferos del MUNHINA. En términos generales los datos registrados corresponden a la localidad de colecta, los responsables de la misma, datos biológicos y reproductivos del ejemplar, medidas estándar, estado del tiempo y método de colecta. Para cada ejemplar se prepara la piel, cráneo y esqueleto post-craneal, o se conserva el animal completo en líquido (formol al 10% o alcohol 70°), se conservan también por separado muestras de tejido (hígado) en alcohol 90°, ecto y endoparásitos, el pene en el caso de los machos y embriones en caso de hembras preñadas.



Figura 2. Extracción de sangre por punción cardíaca en *Desmodus rotundus*. Río Grande do Sul. Foto cortesía de Eduardo Reolón

Los ejemplares fueron sangrados mediante punción cardíaca bajo anestesia. Para disminuir el riesgo de accidentes por mordedura de los animales, luego de la anestesia y tras comprobar la no reacción de los animales, estos fueron inmovilizados sujetándolos por las alas como muestra la figura 2; en esta posición se elimina el riesgo de mordida, aun cuando el animal se despertara de la anestesia. En el caso del zorro, el sangrado se realizó por punción cardíaca con el ejemplar ya muerto. La anestesia se realizó en recipientes

herméticos introduciendo un algodón empapado en éter, el trabajo se realizó al aire libre de manera de minimizar los riesgos para los investigadores; la muerte del animal se da por exanguinación (ASM 2006). La sangre se conservó en viales en frío (sin congelar) hasta su transporte al laboratorio. Una gota de sangre de cada ejemplar fue utilizada para realizar frotis para detección de *Trypanosoma spp.* Toda la manipulación de los ejemplares fue realizada por personal entrenado y debidamente inmunizado contra la rabia.

4.6. Conservación de las muestras

La extracción del suero se realizó por centrifugación a 1500 rpm durante cinco minutos. Se inactivó el complemento por calor sumergiendo las muestras en baño maría a 56° C durante 30 minutos. Finalmente el suero fue fraccionado en alícuotas de 200 µl y conservado a -20° C hasta su procesamiento.

5. Resultados

5.1. Cultivos celulares, virus y sueros control

Tabla 1. Resultados de la titulación mediante las dos técnicas *in vitro*: “rápida” y “lenta” en ambos lotes de virus. Resultados obtenidos de observación de 20 campos al azar para cada muestra, a una amplificación total de 400x. Se consideraron como positivos los campos que presentaron al menos un foco de fluorescencia específica.

Logaritmo de la dilución	Campos positivos sobre totales	Valores acumulados		Campos positivos sobre totales	Porcentaje
		Positivos	Negativos		
Lote 810807 titulación “lenta”					
-1	20/20	60	0	60/60	100
-2	20/20	40	0	40/40	100
-3	20/20	20	0	20/20	100
-4	0/20	0	20	0/20	0
-5	0/20	0	40	0/40	0
-6	0/20	0	60	0/60	0
$FFD_{50}/200\mu l = 10^{-4+[(50-0)/(100-0)]*1} = 5 \times 10^{-3.50} FFD_{50}/ml$					
Lote 810808 titulación “lenta”					
-1	20/20	80	0	80/80	100
-2	20/20	60	0	60/60	100
-3	20/20	40	0	40/40	100
-4	13/20	20	7	20/27	74
-5	6/20	7	21	7/28	25
-6	1/20	1	40	1/41	2
$FFD_{50}/200\mu l = 10^{-5+[(50-25)/(74-25)]*1} = 5 \times 10^{-4.49} FFD_{50}/ml$					
Lote 810807 titulación “rápida”					
-1	20/20	70	0	70/70	100
-2	20/20	50	0	50/50	100
-3	20/20	30	0	30/30	100
-4	9/20	10	11	10/21	48
-5	1/20	1	30	1/31	3
-6	0/20	0	50	0/50	0
$FFD_{50}/200\mu l = 10^{-4+[(50-48)/(100-48)]*1} = 5 \times 10^{-3.97} FFD_{50}/ml$					
Lote 810808 titulación “rápida”					
-1	20/20	71	0	70/70	100
-2	20/20	51	0	50/50	100
-3	20/20	31	0	30/30	100
-4	9/20	11	11	10/21	50
-5	1/20	2	30	1/32	6
-6	1/20	1	49	1/50	2
$FFD_{50}/200\mu l = 10^{-5+[(50-6)/(100-6)]*1} = 5 \times 10^{-4.53} FFD_{50}/ml$					

Los cultivos en paralelo mostraron un mejor desempeño de las células en el medio mínimo suplementado con SFB al 10% y Glucosa a una concentración final de 4.5g/l. El crecimiento de las células fue mayor y se lograron cultivos con repiques 1:3 cada 72 horas ajustando la concentración a 2.5×10^5 cel/ml.

La titulación por ambos métodos dio resultados similares en ambos lotes de virus (810807 y 810808), la Tabla 1 muestra los resultados de las dos técnicas utilizadas en la titulación *in vitro* por focos fluorescentes (FFD₅₀): “rápida” (adición de las células sobre el virus) y “lenta” (cultivo de las células durante 24 horas previo a la adición del virus). La Tabla 2 muestra la comparación de los títulos obtenidos para cada lote viral por las tres técnicas utilizadas: LD50 (*in vivo*) y FFD50 (*in vitro*, “rápida” y “lenta”). Como inóculo para el testeo de los sueros se utilizaron 200µl de una dilución 1:1000 del lote 810808 [cuyo título fue $5.0 \times 10^{4.53}$ FFD₅₀/ml] conteniendo unas 34 FFD₅₀.

El suero del cobayo virgen (control -) no mostró inhibición de la infección en la dilución 1:5, observándose un 100% de los campos positivos. El suero del cobayo vacunado, correspondiente al segundo sangrado (3^a dosis), inhibió completamente la infección (0% de campos positivos) hasta la dilución 1:10. La dilución siguiente (1:20) mostró aproximadamente el 50% de los campos positivos y las subsiguientes diluciones no mostraron inhibición. No se observaron efectos citotóxicos de los sueros de cobayo en la dilución 1:5.

Tabla 2. Título viral en los lotes 810807 y 810808 calculados mediante titulación *in vivo* (LD₅₀/ml) y dos técnicas *in vitro* alternativas (FFD₅₀/ml)

Lote Virus	<i>in vivo</i> (LD ₅₀ / ml)	<i>in vitro</i> (FFD ₅₀ / ml)	
		“rápida”	“lenta”
810807	$3.3 \times 10^{5.8}$	$5 \times 10^{3.97}$	$5 \times 10^{3.50}$
810808	$3.3 \times 10^{5.9}$	$5 \times 10^{4.53}$	$5 \times 10^{4.49}$

5.2. Testeo de los sueros

Se analizaron sueros provenientes de siete especies de quirópteros (*Eptesicus diminutus*, *E. furinalis*, *Eumops bonariensis*, *Desmodus rotundus*, *Molossops temminckii*, *Molossus molossus* y *Tadarida brasiliensis*), representantes de las tres familias registradas en Uruguay, y una muestra obtenida de un ejemplar de zorro de monte (*Cerdocyon thous*). Los ejemplares fueron colectados en cinco

localidades, tres de ellas ubicadas en el departamento de Rivera, en el noreste del País. La tabla 3 muestra los detalles de las muestras analizadas y el resultado obtenido. En las muestras que se clasifican como “Hemolizadas” no se pudo obtener un resultado concluyente por el efecto citotóxico del suero. No se testaron sueros obtenidos en salidas de campo previas debido al pobre estado de conservación de los mismos. Tres *D. rotundus* colectados en la zona de Minas de Corrales y el ejemplar de *C. thous* colectado en la forestal FYMSA presentaron anticuerpos neutralizantes para el virus de la rabia.

Tabla 3. Muestras de campo analizadas mediante RFFIT. Se destacan los ejemplares en que se detectaron anticuerpos neutralizantes antirrábicos. La muestra GBN 59, estaba fuertemente hemolizada, a pesar de lo cual se observó una moderada inhibición de la infección. En el suero de GBN 62 se observó inhibición claramente a pesar de que se encontraba ligeramente hemolizado.

Numero	Especie	Localidad	Dpto.	Fecha	Resultado
EMG 1873	<i>Eptesicus furinalis</i>	El Pinar	Canelones	13/09/2007	Hemolizado
EMG 1874	<i>Desmodus rotundus</i>	Esteros de Farrapos	Rio Negro	16/11/2007	Hemolizado
EMG 1875	<i>Molossops temminckii</i>	Esteros de Farrapos	Rio Negro	16/11/2007	Hemolizado
EMG 1876	<i>Eumops bonariensis</i>	Esteros de Farrapos	Rio Negro	16/11/2007	Hemolizado
EMG 1877	<i>Eumops bonariensis</i>	Esteros de Farrapos	Rio Negro	16/11/2007	Hemolizado
EMG 1879	<i>Eptesicus diminutus</i>	Esteros de Farrapos	Rio Negro	16/11/2007	Hemolizado
EMG 1881	<i>Eumops bonariensis</i>	Esteros de Farrapos	Rio Negro	17/11/2007	Hemolizado
EMG 1886	<i>Eumops bonariensis</i>	Esteros de Farrapos	Rio Negro	17/11/2007	<5
EMG 1887	<i>Molossus molossus</i>	Esteros de Farrapos	Rio Negro	17/11/2007	Hemolizado
EMG 1888	<i>Molossus molossus</i>	Esteros de Farrapos	Rio Negro	17/11/2007	Hemolizado
GBN 49	<i>Desmodus rotundus</i>	Minas de Cuñapirú	Rivera	28/11/2007	Hemolizado
GBN 50	<i>Desmodus rotundus</i>	Minas de Cuñapirú	Rivera	28/11/2007	Hemolizado
GBN 51	<i>Desmodus rotundus</i>	Minas de Cuñapirú	Rivera	28/11/2007	Hemolizado
GBN 53	<i>Desmodus rotundus</i>	Minas de Cuñapirú	Rivera	28/11/2007	<5
GBN 56	<i>Tadarida brasiliensis</i>	FYMNSA	Rivera	28/11/2007	<5
GBN 57	<i>Desmodus rotundus</i>	Minas de Corrales	Rivera	05/12/2007	>5
GBN 59	<i>Desmodus rotundus</i>	Minas de Corrales	Rivera	05/12/2007	Dudoso
GBN 60	<i>Desmodus rotundus</i>	Minas de Corrales	Rivera	05/12/2007	>5
GBN 61	<i>Desmodus rotundus</i>	Minas de Corrales	Rivera	05/12/2007	<5
GBN 62	<i>Desmodus rotundus</i>	Minas de Corrales	Rivera	05/12/2007	>5*
GBN 63	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Santa Ernestina	Rivera	06/12/2007	Hemolizado
GBN 64	<i>Cerdocyon thous</i>	FYMNSA Ruta 5 Km 452	Rivera	06/12/2007	>5

La Figura 3 muestra cuatro micrografías tomadas sobre dos campos, uno de un control de virus y el otro correspondiente a la muestra GBN 64. Para cada uno de los campos, se tomaron dos micrografías: una de epifluorescencia y la otra en campo claro. En la imagen de epifluorescencia del control viral, se observa claramente la presencia de puntos de fluorescencia específica, mientras que los mismos están ausentes en la correspondiente a la muestra del *C. thous*.

No se encontraron evidencias de infección por *Trypanosoma spp.* en ninguna de las muestras estudiadas.

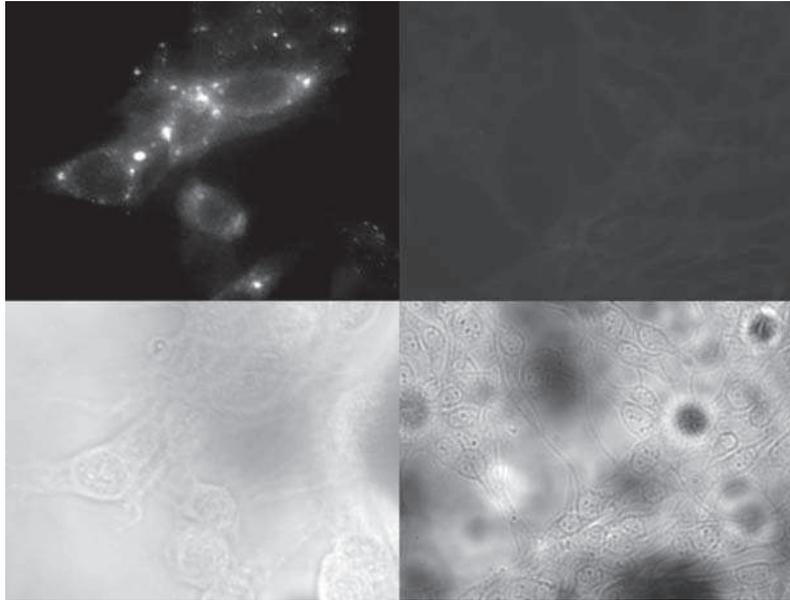


Figura 3. Micrografías de las muestras teñidas, las imágenes superiores corresponden a fotografías de epifluorescencia, las inferiores a fotografías de campo claro. A la izquierda se observa un control de virus en el que se distinguen claramente los puntos de fluorescencia específica en el citoplasma. A la derecha se observa un campo correspondiente a la muestra GBN 64 en el que no se observa fluorescencia específica.

6. Discusión

El presente trabajo constituye el primer registro de la utilización del RFFIT para determinar la presencia de anticuerpos antirrábicos en sueros de animales silvestres en Uruguay. La principal ventaja que presenta esta técnica es que puede ser aplicada a sueros de cualquier especie animal sin necesidad de contar con reactivos específicos para cada una de ellas (a diferencia de la inmunofluorescencia indirecta). Esto la convierte en una técnica de especial utilidad para realizar relevamientos serológicos en fauna silvestre. La realización de la seroneutralización en cultivos celulares tiene la ventaja de ser más controlada, más rápida, además de no requerir el sacrificio de animales lo que la convierte en una opción éticamente más apropiada y más segura en la manipulación del agente infeccioso. Por último, una vez que se cuenta con las instalaciones y equipos necesarios para el mantenimiento de los cultivos celulares, resulta más económica (Smith *et al.*, 1996).

Por otro lado, ésta técnica permite cuantificar anticuerpos neutralizantes, por lo que su resultado puede ser interpretado como una estimación del nivel de protección frente a la infección que posee un individuo. Si bien en animales no está determinado el nivel protector para cada especie, se considera que un valor superior a 0.5 UI/ml es el mínimo valor medible de anticuerpos que representa un nivel de inmunidad correlacionado con una protección eficaz contra la infección en animales domésticos (caninos y felinos) (WHO, 1992).

La técnica, tal cual fue realizada en este trabajo, es de carácter cualitativo por no contar con un suero previamente titulado, como referencia. Se solicitó a OPS el suero de referencia internacional para realizar la calibración de los sueros control utilizados en este trabajo pero debido a dificultades en el envío internacional del material, el mismo no estuvo disponible. se estableció como punto de corte para considerar una muestra positiva la dilución 1:5 (título mayor o igual a 5). Valores similares han sido utilizados en otros trabajos (Lord *et al.*, 1975¹; Lord *et al.*, 1975²; Price & Everard, 1977; Trimarchi & Debbie, 1977; Hill *et al.*, 1992; Serra-Cobo *et al.*, 2002) para realizar "screenings". El valor de dilución utilizado permite fácilmente discriminar los sueros negativos, y corresponde a la dilución más baja en la que no se observaron efectos citotóxicos del suero en ninguna de las especies con las que se trabajó.

Los sueros control utilizados fueron conservados de manera de poder ser calibrados una vez que se tenga acceso al suero de referencia internacional. Se detectó respuesta inmune humoral en tres ejemplares de vampiros (*D. rotundus*) y un zorro (*C. thous*). Las muestras de *D. rotundus* que resultaron con un título superior a 5 (y fueron entonces clasificadas como positivas para este estudio) provienen de una zona cercana a la del surgimiento del brote pero en la que no se registraron casos de rabia en ganado ni en fauna silvestre. La presencia de anticuerpos específicos en el suero, indica la exposición del animal al virus y puede revelar una infección subclínica o abortiva. Lord y colaboradores (1975) realizaron seguimientos de la respuesta inmune humoral en poblaciones de vampiros, vinculado a la aparición de brotes de rabia parálitica bovina en el norte argentino. Estos investigadores mostraron que la probabilidad de encontrar ejemplares seropositivos en una localidad previo a la aparición de un brote de rabia en el ganado, es muy inferior a la de detectar la respuesta en ejemplares de localidades en las que ya se dio un brote en meses anteriores (Lord *et al.*, 1975²). Los anticuerpos detectados en el suero de *C. thous*, pueden indicar un salto inter-específico del virus, sugiriendo que ese ejemplar tuvo contacto con el virus que circulaba en la zona en *D. rotundus*. La presencia de anticuerpos en sueros de carnívoros puede indicar la intervención de los zorros en el ciclo de la rabia e incluso la posibilidad de transmisión a través de estos al ganado. Esta posibilidad depende de múltiples factores, entre otros la densidad de las poblaciones de las especies huésped (Lord *et al.*, 1975¹). En cuanto a los vampiros, la importante oferta de alimento que constituye el ganado, y la disponibilidad de refugios, ha hecho que la especie se encuentre prácticamente en todo el país, presentando colonias de varios miles de individuos. En esta situación la posibilidad de transmisión del virus entre diferentes especies silvestres, puede verse incrementada. Sin embargo no se ha evaluado aún en Uruguay el impacto que los profundos cambios en el uso de la tierra, producidos en los últimos años, pueden haber implicado para estas poblaciones, ni la frecuencia de los contactos entre carnívoros silvestres y vampiros.

La situación epidemiológica del país respecto de la rabia, muestra circulación de al menos tres variantes virales diferentes, infección comprobada en cuatro

especies de murciélagos y focos activos de infección en ganado (CONHASA, 2007; CONHASA, 2008²; Guarino *et al.*, 2008¹; Guarino *et al.*, 2008²).

Los saltos ínter específicos del virus desde quirópteros a carnívoros han sido registrados anteriormente (Badrane & Tordo, 2001). Estos saltos pueden resultar en una adaptación del virus al nuevo huésped, o una extinción del linaje. Al menos dos saltos con posterior adaptación, desde quirópteros a carnívoros, explicarían la actual distribución de variantes dentro del virus de la rabia (Badrane & Tordo, 2001). La presencia de anticuerpos en el suero de un carnívoro silvestre dentro del área del brote de rabia paralítica transmitida por quirópteros hematófagos, sugiere la exposición de este animal a ese ciclo. No se detectaron variantes virales asociadas a carnívoros en los casos de rabia paralítica registrados en el ganado de la zona (CONHASA, 2008¹), esto reforzaría la hipótesis de que la exposición del zorro haya sido a un virus circulante en quirópteros, lo que deberá ser comprobado en posteriores estudios.

7. Conclusiones y perspectivas.

Se presenta un protocolo aplicable a vigilancia epidemiológica de la rabia en especies silvestres, así como también, útil para realizar seguimientos de la respuesta inmune generada mediante la vacunación.

La técnica puesta a punto puede ser utilizada en relevamientos en fauna silvestre, particularmente carnívoros y murciélagos, como instrumento para elaborar índices de riesgo, en este contexto, la ausencia de anticuerpos en poblaciones de *D. rotundus* podría ser interpretado como un indicador de susceptibilidad de la colonia a contraer la enfermedad y por tanto la probabilidad de comenzar un brote con transmisión a especies domésticas.

El presente trabajo constituye la primera evidencia de respuesta inmune humoral antirrábica en especies silvestres de Uruguay, así mismo los resultados sugieren la participación de carnívoros silvestres en el ciclo de la enfermedad durante el brote registrado a fines de 2007 en los departamentos de Rivera y Tacuarembó en el Norte del País. Posteriores estudios serán necesarios para aclarar el verdadero rol que cumplen estas especies en la dinámica de la enfermedad dentro de la fauna salvaje.

8. Bibliografía

- Amasino, C. F.; C. J. Garbi & M. F. Amasino. 2002. La rabia urbana en la Provincia de Buenos Aires, Argentina: origen – evolución – actualidad. *Analecta Veterinaria* 22(1): 17-31. Buenos Aires.
- American Society of Mammalogist. 2006. Guidelines for the capture, handling and care of mammals. Animal Care and Use Committee.
- Badrane, H. & N. Tordo. 2001. Host switching in *Lyssavirus* history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *Journal of Virology* 75(17):8096-8104.
- Barquez, R. M.; M. A. Mares & J. K. Braun. 1999. The Bats of Argentina. *Special Publications. Museum of Texas Tech University* 42: 1-275. Texas.
- CONHASA. 2007. Acta 121 Comisión Nacional Honoraria de Salud Animal. 5 de noviembre de 2007.
http://www.mgap.gub.uy/DGSG/CONAHS/Conahsa_Actas.htm. Acceso: 05 mayo 2009.
- CONHASA. 2008¹. Acta 132 Comisión Nacional Honoraria de Salud Animal. 11 de agosto de 2008.
http://www.mgap.gub.uy/DGSG/CONAHS/Conahsa_Actas.htm. Acceso: 05 mayo 2009.
- CONHASA. 2008². Acta 138 Comisión Nacional Honoraria de Salud Animal. 22 de diciembre de 2008.
http://www.mgap.gub.uy/DGSG/CONAHS/Conahsa_Actas.htm. Acceso: 05 mayo 2009.
- Corey, L. 1998. Virus de la Rabia y otros rabdovirus. En Fauci, A. S.; E. Braunwald; K. J. Isselbacher; J. D. Wilson; J. B. Martin; D. L. Kasper; S. L. Hauser & D. L. Longo (Eds.), *Principios de Medicina Interna de Harrison*. 14^a Edición. Pp.1293-1295.
- Favi, M.; V. Young; C. Pavletic; E. Ramirez; C. de Mattos & C. A. de Mattos. 1999. Rol de los murciélagos insectívoros en la transmisión de la rabia en Chile. *Arch. Med. Vet.* 31(2): 157-165.
- González, E. M. 2001. Guía de campo de los mamíferos de Uruguay. Introducción al estudio de los mamíferos. *Vida Silvestre, Sociedad Uruguaya para la Conservación de la Naturaleza*. Uruguay. pp. 1-399. Montevideo.
- Guarino, H.; S. Rodríguez; G. Willat; G. Botto; M. Favi & I. Kotait. 2008. Surveillance of enzootic rabies in non-hematophagous bat population in Montevideo, Uruguay.

- RITA XIX. International Conference on Rabies in the Americas. Atlanta, GA 2008. Abstracts book. Pp. 108.
- Guarino, H.; S. Rodríguez; G. Willat; J. Souto; G. Botto; M. R. Castro *et al.* 2008. Vigilancia de la rabia enzoótica en poblaciones de murciélagos no hematófagos en zonas urbanas y suburbanas del Uruguay. Mención Honorífica, Premio 2008 para trabajos científicos. Academia Nacional de Veterinaria. Uruguay.
- Hill, R. E. Jr.; G. W. Beran & W. R. Clark. 1992. Demonstration of rabies virus-specific antibody in the sera of free-ranging Iowa raccoons (*Procyon lotor*). *Journal of Wildlife Diseases* 28(3): 377-385.
- Lord, R. D.; H. Delpietro; E. Fuenzalida; A. M. O. de Díaz & L. Lázaro. 1975. Presence of rabies neutralizing antibodies in wild carnivores following an outbreak of bovine rabies. *Journal of Wildlife Diseases* 11: 210-213.
- Lord, R. D.; E. Fuenzalida; H. Delpietro; O. P. Larghi; A. M. O. de Díaz & L. Lázaro. 1975. Observations on the epizootiology of vampire bats rabies. *PAHO Bulletin* 9(3): 189-195.
- Price J. L. & C. O. R. Everard. 1977. Rabies virus and antibody in bats in Grenada and Trinidad. *Journal of Wildlife Diseases* 13: 131-134.
- Ruprecht, C. E.; J. S. Smith; M. Fekadu & J. E. Childs. 1995. The ascension of Wildlife Rabies: a cause of public health concern or intervention?. *Emerging Infectious Diseases* 1(4): 107-114.
- Salvatella, R. 2002. Rabia en Uruguay (1966 – 2002). Seminario Virus y Virología Médica. Serie Monografías del Instituto de Higiene 2. Montevideo.
- Schneider, M. C. 1995. Reflexión sobre los modelos para el estudio de los brotes de rabia humana por murciélago. *Cad. Saúde Pública* 11(2): 291-304. Río de Janeiro.
- Schneider, M. C.; G. A. de Alameida; L. M. Souza; N. B. de Moraes & R. C. Díaz. 1996. Controle da raiva no Brasil de 1980 a 1990. *Rev. Saúde Pública* 30(2): 196-203. Sao Paulo.
- Schneider, M. C.; A. Belotto; M. P. Adé; L. F. Leanes; E. Correa; H. Tamayo *et al.* 2005. Situación epidemiológica de la rabia humana en América Latina en 2004. *Boletín Epidemiológico OPS* 26(2): 2-4.
- Serra-Cobo, J.; B. Amengual; C. Abellán & H. Bourhy. 2002. European bat *Lyssavirus* infection in Spanish bat populations. *Emerging infectious diseases* 8(4): 413-420.
- Sheeler-Gordon L. L. & J. S. Smith. 2001. Survey of bat populations of Mexico and Paraguay for rabies. *J. Wildlife Dis.* 37(3): 582-593.

- Smith, J. S., P. A. Yager, & G. M. Baer. 1996. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. *En Laboratory techniques in rabies*, F.-X. Meslin, M. M. Kaplan, and H. Koprowski (eds.). 4th Edition. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 181–191.
- Tosi, H.; R. Somma; M. H. de Giordano & C. Bauza. 1968. Virus y virosis médicas. Oficina del Libro, Asociación de Estudiantes de Medicina. Montevideo. Pp. 1-303.
- Trimarchi, C. V. & J. Debbie. 1977. Naturally occurring rabies virus and neutralizing antibodies in two species of insectivorous bats of New York State. *Journal of Wildlife Diseases* 13: 366-369.
- World Health Organization Expert Committee on Rabies. 1992. Eighth report. World Health Organization Technical Report Series 824. 84pp.

9. Anexos

9.1. Anexo 1. Procedimiento Operativo Estandar: Detección de anticuerpos antirrábicos mediante Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test

Titulación de anticuerpos por Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT)

Introducción:

El test rápido de inhibición de focos fluorescentes (RFFIT) permite detectar y cuantificar anticuerpos neutralizantes en muestras de suero mediante la neutralización de una dosis constante de virus por diluciones seriadas de suero. El virus no neutralizado es visualizado a través de la infección de un cultivo celular en monocapa y posterior tinción por inmunofluorescencia directa. La cuantificación se realiza por comparación entre el título obtenido en los sueros problema, contra el título obtenido utilizando un suero estándar de referencia de título conocido.

Objetivo:

Describir el procedimiento para la realización de un ensayo de RFFIT.

Materiales:

- Estufa húmeda (37° C, 5% CO₂)
- Cell-culture chamber slides de 4 pocillos
- Minimum Essential Medium (MEM 432) + glucosa (concentración final: 4.5 g/l) suplementado con Suero Fetal Bovino (descomplementado: 56 ° C, 30 minutos) al 10%
- Virus rabia (cepa PV), 10 FFD₅₀/200µl
- Suero control positivo (suero de cobayo vacunado, 3 dosis (días 0; 8 y 35) sangrado al día 50)
- Suero control negativo (Suero de cobayo virgen)
- Sueros a testar
- Cultivo celular BHK monocapa.
- Acetona (-20° C)
- Anticuerpos antirrábicos conjugados con FITC (VMRD)

Procedimiento:

- Descongelar y descomplementar los sueros control y los sueros a testar en baño maría, 56° C durante 30 minutos.
- Preparar diluciones 1:5 de los sueros agregando 50µl de suero a 200µl de MEM al 10% SFB
- Mezclar los sueros el virus de descarga directamente en los pocillos de la cell-culture chamber slide. En una primer lámina sembrar los controles según el siguiente esquema.
 - o Control de Células: 400µl MEM 10% SFB
 - o Control Virus: 200µl virus PV (10 FFD₅₀/200µl) + 200µl MEM 10% SFB

- Control Negativo: 200µl suero control **negativo** (dilución 1:5)+ 200µl virus PV (10 FFD₅₀/200µl)
- Control Positivo: 200µl suero control **positivo** (dilución 1:5) + 200µl virus PV (10 FFD₅₀/200µl)

En otra lámina sembrar las muestras a testar, mezclando 200µl del suero problema (dilución 1:5) + 200µl virus PV (10 FFD₅₀/200µl)

- Incubar en estufa húmeda a 37° C, 5 % CO₂ durante 90 minutos.
- Durante la incubación:
 - Tripsinizar una botella de cultivo de BHK en monocapa con 48 horas y 100% de confluencia.
 - Diluir en 20ml de MEM al 10% SFB + 4.5 g/l glucosa
 - Centrifugar a 1000 RPM durante 1:45 minutos
 - Descartar el sobrenadante y resuspender en MEM al 10% SFB + 4.5 g/l glucosa llevando a una concentración de 2.5x10⁵ cel/ml
- Sembrar 400µl de la suspensión de células en cada pocillo.
- Incubar durante 20 horas a 37° C, 5% CO₂
- Terminada la incubación descartar el sobrenadante en una solución virucida de hipoclorito de sodio y desarmar la cell-culture chamber slide, retirando las paredes plásticas de las cámaras.
- Fijar en acetona fría (-20° C) durante 30 minutos
- Sacar de la acetona, dejar secar y teñir con 30µl del conjugado antirrábico VMRD (endpoint 1:8) + 90µl de PBS pH=7. Mantener en cámara húmeda a 37° C durante 30 minutos.
- Lavar por 10 minutos en PBS, pH=7 a 37°C, con agitación magnética.
- Dejar secar
- Retirar el sellante de goma, de que unía las paredes de las cámaras, y montar con glicerina bufferada (50% en PBS)
- Observar en microscopio de fluorescencia con un aumento total de 200x

Interpretación de los resultados:

Controles:

El control de virus, y el suero control negativo deben mostrar fluorescencia específica en el 100% de los campos observados (contar 20 campos)

En el control de células y el suero control positivo no debe observarse fluorescencia específica.

Sueros problema:

Los sueros se considerarán positivos si se observa una reducción del 50% de los campos con fluorescencia específica (<10 campos positivos en 20 observados elegidos al azar)

Referencias:

SMITH, J. S., P. A. YAGER, AND G. M. BAER. 1996. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. *En* Laboratory techniques in rabies, F.-X. Meslin, M. M. Kaplan, and H. Koprowski (eds.). 4th Edition. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 181–191.

Responsable:

Personal entrenado y calificado del sector virología y/o control de calidad

9.2. Anexo 2. Clave de campo para la determinación de las especies de molósidos (Mammalia: Chiroptera) de Uruguay en base a caracteres externos (visibles sin realizar incisiones).

Familia **Molossidae**

1.
 - a. Presencia de pliegues verticales en el labio superior.....2
 - b. Labio superior sin pliegues verticales.....4
2.
 - a. Largo del antebrazo (AB) mayor a 50mm....*Nyctinomops macrotis*
 - b. Largo del antebrazo (AB) menor de 50mm.....3
3.
 - a. Segunda falange del cuarto dedo mayor a 5 mm.....
.....*Tadarida brasiliensis*
 - b. Segunda falange del cuarto dedo menor de 5 mm.....
.....*Nyctinomops laticaudatus*
4.
 - a. Orejas notoriamente separadas sobre la cabeza. Largo del antebrazo (AB) menor de 35mm.....
.....*Molossops temminckii*
 - b. Orejas unidas o aparentemente unidas sobre la línea media de la cabeza. Largo del antebrazo (AB) mayor a 35mm.....
.....5
5.
 - a. Antitrago bien desarrollado, con constricción basal notoria. Quilla nasal presente. Pelo en la cara ventral del ala a lo largo del antebrazo.....6
 - b. Distinto del anterior.....7
6.
 - a. Incisivos superiores triangulares, convergentes, proyectados hacia abajo.....*Molossus molossus*
 - b. Incisivos superiores caniniformes, divergentes, proyectados hacia delante.....*Promops centralis*
7.
 - a. Largo del antebrazo (AB) mayor a 45 mm
.....*Eumops bonariensis*
 - b. Largo del antebrazo (AB) menor de 45mm
.....*Eumops patagonicus*

9.3. Anexo 3. Hoja del catálogo detallado de campo.

GERMAN BOTTO (GBN)
CATÁLOGO DE CAMPO

Nº de catálogo **GBN**

Localidad: _____
 Latitud: _____ Longitud: _____ Altitud: _____
 Día: _____ Mes: _____ Año: _____ Estación: _____
 Género: _____ Especie: _____
 Subespecie _____ Sexo: _____
 Largo total: _____ Cola: _____ Pata con uña: _____
 Pata sin uña: _____ Oreja: _____ Antebrazo: _____ Peso: _____
 Colector: _____
 Preparador: _____

Modo de preparación:

Piel <input type="checkbox"/>	Líquido <input type="checkbox"/>	Modo de captura: _____
Piel y esqueleto <input type="checkbox"/>	Líquido con cráneo extraído <input type="checkbox"/>	Altura en red: _____
Piel y cráneo <input type="checkbox"/>	Piel, cráneo extraído y carcaza en líquido <input type="checkbox"/>	Tipo de cebo: _____
Sólo esqueleto <input type="checkbox"/>		Hora: _____

Hábitat:

Pradera: campo pastoreado <input type="checkbox"/>	Humedal: pajonal <input type="checkbox"/>	Monte: ribereño <input type="checkbox"/>
pastizal <input type="checkbox"/>	bañado <input type="checkbox"/>	serrano <input type="checkbox"/>
borde de camino <input type="checkbox"/>	borde: laguna <input type="checkbox"/>	quebrada <input type="checkbox"/>
Otro: _____ <input type="checkbox"/>	curso de agua <input type="checkbox"/>	parque <input type="checkbox"/>
Urbano <input type="checkbox"/>		borde de camino <input type="checkbox"/>
Suburbano <input type="checkbox"/>		plantación forestal <input type="checkbox"/>
Rural peridoméstico <input type="checkbox"/>		otro: _____ <input type="checkbox"/>
% de suelo cubierto: _____	Altura aprox. de la vegetación: _____	

Estado del tiempo:

Cielo despejado a muy pocas nubes <input type="checkbox"/>	Cubierto con lloviznas <input type="checkbox"/>	Sol → lluvia <input type="checkbox"/>
Parcialmente cubierto <input type="checkbox"/>	Día lluvioso <input type="checkbox"/>	Lluvia → sol <input type="checkbox"/>
Total o casi totalmente cubierto <input type="checkbox"/>	Tormenta <input type="checkbox"/>	

Observaciones (horario de eventos): _____

Temperatura: _____ **Humedad:** _____ **Viento** _____ **Momento** _____ **Día** _____

Normal <input type="checkbox"/>	Sin viento <input type="checkbox"/>
Húmedo <input type="checkbox"/>	Con brisa <input type="checkbox"/>
	Con viento <input type="checkbox"/>

Condición sexual:

Macho	Hembra	Lactación:
Testículos abdominales <input type="checkbox"/>	Vagina cerrada <input type="checkbox"/>	Lactando <input type="checkbox"/>
Testículos semiescrotales <input type="checkbox"/>	Vagina semiabierta <input type="checkbox"/>	Mamas desarrolladas <input type="checkbox"/>
Testículos escrotales <input type="checkbox"/>	Vagina abierta <input type="checkbox"/>	Mamas poco desarrolladas <input type="checkbox"/>
Otros: _____	Otros: _____	Inactivas <input type="checkbox"/>
Tamaño del testículo: _____	Prefiada: Nº de embriones: _____	Mamas post-lactantes <input type="checkbox"/>
Largo: _____	Izquierda: _____ Derecha: _____	
Ancho: _____	Corona-Rabadilla: _____	
	Embriones conservados: _____	
	Marcas de embriones en el útero: _____	

Muestras:

Tejidos: _____		Parásitos:
Hígado <input type="checkbox"/>	Músculo <input type="checkbox"/>	Intestino <input type="checkbox"/>
Riñón <input type="checkbox"/>	Contenido digestivo <input type="checkbox"/>	Pene <input type="checkbox"/>
Corazón <input type="checkbox"/>	Estómago <input type="checkbox"/>	
Otros: _____		Ectoparásitos <input type="checkbox"/>
		Ubicación: _____
		Endoparásitos <input type="checkbox"/>
		Ubicación: _____
		Otros: _____

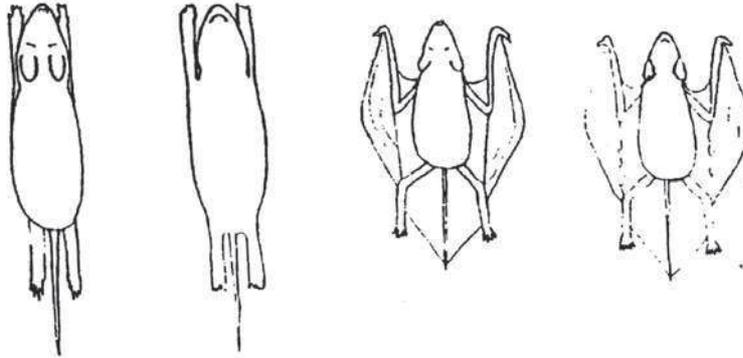
Edad:

- Juvenil
- Semiadulto
- Adulto

Muda:

- Con muda
- Sin muda

Determinado de acuerdo a: _____



Largo de intestino:

Delgado: _____
Grueso: _____

Grasa:

- Nada
- Apenas
- Mediana
- Mucha

Muestras anexas:

- Fotos ejemplar vivo
- Fotos ejemplar muerto
- Fotos de estructuras
- Otras muestras: _____
- Fotos de ambiente
- Heces
- Nidos o refugios

Observaciones:

Colección de depósito: _____ Número: _____

Análisis de ADN antiguo muy degradado de restos óseos humanos hallados en el territorio uruguayo

Informe de pasantía para la Licenciatura en Biología
Humana
Laboratorio de ADN antiguo del
Departamento de Antropología Biológica
Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación
Universidad de la República

Ana Lía Ciganda Garrido
C.I.: 4.105.351-1
Tutora: Dra. Mónica Sans

AGRADECIMIENTOS

-Agradezco especialmente al Mag. Sc. Gonzalo Figueiro, encargado del Laboratorio de ADN antiguo del Departamento de Antropología Biológica (Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación), por su dedicación, paciencia y disposición. Este trabajo hubiera sido imposible sin sus aportes, desde la enseñanza de las técnicas hasta el análisis de los resultados. Algunos de los resultados que incluyo en este trabajo surgieron de ensayos realizados por Gonzalo, lo cual es un ejemplo de la generosidad que siempre mostró hacia mi persona.

-Otro agradecimiento especial es para mi tutora, la Dra. Mónica Sans, por darme la oportunidad de realizar esta pasantía y por acompañarme el proceso bastante de cerca, estando a disposición de responder todas las inquietudes que fueron surgiendo. Particularmente valoro la profesionalidad y eficiencia de su aporte y el tiempo dedicado a la corrección.

-Agradezco también a la otra integrante del Laboratorio, Elizabeth Ackermann, por colaborar en los ensayos y mostrarme algunos procedimientos de la etapa post-PCR, principalmente por todas las corridas de geles que realizó para este trabajo.

-Por supuesto que sin el apoyo y estímulo de mi familia y de otras personas queridas se me hubiera hecho más cuesta arriba este proyecto, es por eso que no dejo de agradecerles.

INTRODUCCIÓN

La capacidad de extraer y analizar ADN de restos antiguos tiene una historia relativamente corta. Los estudios iniciales estaban severamente limitados por la naturaleza degradada y fragmentada del ADN antiguo (ADNa), principalmente resultante de fuerzas hidrolíticas y oxidativas que actúan post-mortem. Sin embargo, el campo se vio revolucionado con la introducción del procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar *in vitro* millones de copias de fragmentos cortos de ADN (Kaestle y Horsburgh 2002).

Por muchas razones el ADN mitocondrial (ADNmt) se ha considerado particularmente útil para estudiar la prehistoria. La mitocondria humana es un organelo extra nuclear que contiene una molécula de ADN circular de 16,569 pares de bases de longitud, de la que se conocen todas las posiciones nucleotídicas y los loci codificantes. Debido a que este ADN es heredado únicamente por vía materna y, a diferencia del ADN nuclear, no recombina, todos los cambios en la secuencia del ADNmt son el resultado de mutaciones acumuladas, heredadas de madre a hija. Además el ADNmt muta con un orden de magnitud más rápido que lo que lo hace el ADN nuclear, con la región de control mutando a una tasa aún más alta, haciéndola particularmente útil en profundidades de tiempo superficiales. Por último, existen muchas copias de ADNmt en condición haploide en cada célula, siendo fácilmente analizado en el laboratorio y más factible de ser recuperado del material biológico prehistórico en cantidades suficientes para poder amplificarlo por PCR (revisado en Eshelman et al. 2003).

La cadena de ADNmt codifica 37 genes que se pueden agrupar por sus productos: 13 genes que codifican para ARN mensajeros y por lo tanto para 13 proteínas; 22 genes que codifican para ARN de transferencia (ARNt), y dos genes que codifican para dos ARN ribosómicos (ARNr) mitocondriales (Domínguez y Hernández 2007). La primera secuencia completa del ADNmt se publicó en 1981 por Anderson et al. y se adoptó como secuencia de referencia; su longitud es de 16,568 nucleótidos. En su obtención se cometieron varios errores de secuenciado (incluida la inserción de una base ajena a la secuencia) que se corrigieron, dando lugar a la actual referencia revisada, abreviada rCRS (Andrews et al. 1999).. La región de control, no codificante, también llamada bucle D, es la estructura que une las dos hebras de la cadena principal y forma la molécula circular por medio de una tercera hebra (Salas et al. 2000). En la región de control se encuentran las regiones hipervariables (HVR) I, II y III, ubicadas entre las posiciones 16024-16383, 57-372 y 438-574 respectivamente (las posiciones siguen la secuencia de referencia de Anderson et al. 1981).

La secuencia de la HVR evoluciona de acuerdo a un patrón complicado que dificulta su análisis. Por ejemplo, la composición de bases no es uniforme, las transiciones ocurren más frecuentemente que las transversiones, el número de transiciones pirimidínicas en la cadena L es mayor que el número de transiciones purínicas y las tasas de sustitución varían de sitio a sitio. Probablemente esta última sea la característica más enigmática; existen sitios "calientes" (*mutational hotspots*), en los cuales se acumulan predominantemente las sustituciones. Las estimaciones de las tasas de mutación de la HVR que se desprenden de análisis de genealogías han generado mucha confusión ya que serían casi 20 veces más altas que las obtenidas a partir de estudios filogenéticos. Los sitios "calientes" podrían ser la causa de esta enorme discrepancia (revisado en Meyer et al. 1999). Heyer et al. (2001) estiman las tasas de mutación promedio (basándose en análisis de genealogías profundas) para las regiones hipervariables I y II en 11,7 mutaciones por sitio y generación, con un intervalo de confianza del 95% de 2,1–31,6.

ADN antiguo y el poblamiento del Nuevo Mundo

Los primeros estudios de variabilidad del ADNmt fueron basados en polimorfismos de sitios de restricción, que mostraron una serie de patrones con aparente especificidad poblacional. El trabajo de Schurr et al. (1990) sobre ADNmt de amerindios arrojó la presencia de diez haplotipos exclusivos, de los cuales cuatro fueron designados por su alta frecuencia como “haplogrupos fundadores” todos ellos de origen asiático: una ganancia de sitio de *HaeIII*, una delección entre la subunidad II de la citocromo oxidasa c (COII) y el gen del ARNt(Lys), una pérdida de sitio de *HincII* y una pérdida de sitio de *AluI* (Figura 1). Estos datos sugerían que el ADN mitocondrial amerindio derivaba de por lo menos cuatro linajes maternos, y que se habrían acumulado variantes en su dispersión por el continente. A los cuatro haplogrupos mencionados, llamados actualmente A, B, C y D, se agrega el haplogrupo X, derivado de una variante presente en poblaciones europeas, lo cual en un principio dio lugar a un debate en cuanto al carácter “fundador” del haplogrupo. Este debate estaría resuelto en virtud de que el haplogrupo X amerindio se distingue del haplogrupo X europeo por dos mutaciones en la región control (una transición G → A en la posición 16213 y una transición A → G en la posición 200, ambas respecto a la secuencia de referencia de Anderson et al. (1981) y por descubrirse la presencia del haplogrupo X en muestras prehistóricas (revisado en Figueiro, 2006).

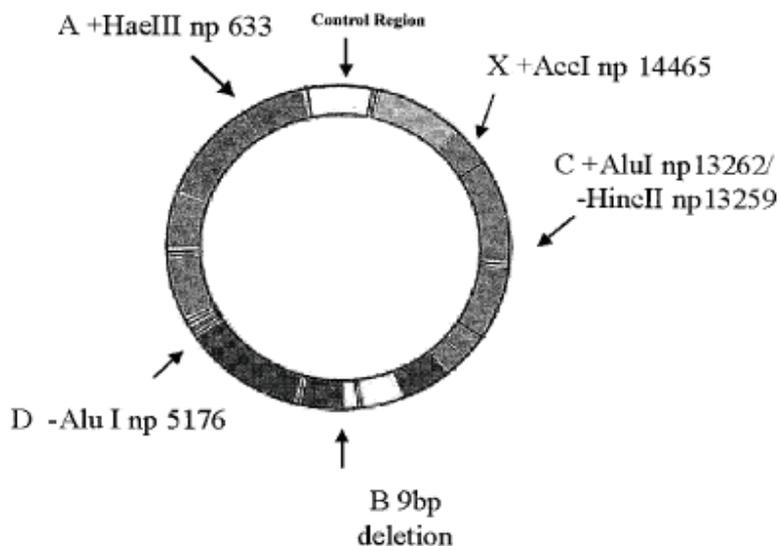


Figura 1. Mapa de la mitocondria humana mostrando la ubicación de la región de control y de los sitios polimórficos, indicando los 5 haplogrupos americanos nativos fundadores conocidos. Tomado de Eshelman et al. (2003)

Posteriormente, diversos trabajos realizados sobre la región hipervariable del ADN mitocondrial humano demostraron una alta variabilidad intrapoblacional en lo referente a mutaciones de esta región; esta variabilidad se agrupó igualmente en *clusters* que pudieron identificarse posteriormente con los patrones de restricción A, B, C y D definidos anteriormente (ver Tabla 1) (Figueiro, 2006).

El análisis del ADNmt antiguo en el Nuevo Mundo ha confirmado ampliamente los hallazgos de estudios de ADN moderno y de otros polimorfismos genéticos. Los haplogrupos mitocondriales A, B, C y D han sido identificados tanto por análisis de polimorfismos de longitud del fragmento de restricción (RFLP) como por secuenciación de la región hipervariable en muchas muestras prehistóricas de América del Norte, Centro y Sur. Las similitudes tanto en las frecuencias de haplogrupos como en

haplotipos específicos del ADN antiguo también indican que el contacto europeo no afectó significativamente la diversidad del ADNmt en las Américas, en su mayoría. La secuencia de la región hipervariable de la gran mayoría de todos los nativos americanos miembros del haplogrupo A comparten la mutación 16111 C→T, la cual no se ve en ninguna población asiática, a excepción de unas pocas en Siberia. Una forma característica del haplogrupo C que incluye la transición C→T en el sitio 16325 y una forma del haplogrupo X que incluye la mutación 16213 T→C están ambas distribuidas en las Américas y ausentes en Asia, sugiriendo a Beringia como fuente y origen único de dichos haplotipos (Eshelman et al. 2003).

Np	<i>Haplogrupo</i>				
	A	B	C	D	X
16111	T	C	C	C	C
16189	T	C	T	T	T
16217	T	C	T	T	T
16223	T	C	T	T	T
16278	C	C	C	C	T
16290	T	C	C	C	C
16298	T	T	C	T	T
16319	A	G	G	G	G
16325	T	T	C	T	T
16327	C	C	T	C	C
16362	C	T	T	C	T
16519	C	T	T	T	T

Tabla 1: Polimorfismos de la región hipervariable I correspondiente a los cinco haplogrupos americanos principales. Los nucleótidos sombreados corresponden a las mutaciones características del haplogrupo. Tomado de Forster et al. (1996) (En: Figueiro, 2006).

La presencia del haplogrupo X ha sido confirmada en sitios prehistóricos y protohistóricos en la meseta Columbia, mientras que datos de secuencias sugieren su presencia en la población prehistórica de Oneota y en América del Sur precolombina. Hauswirth y colaboradores (1994) también reportaron el haplogrupo X hallado en los esqueletos de la laguna Windover (7,000 a 8,000 años AP), aunque otras secuencias generadas en dicho estudio sugieren la posibilidad de contaminación en algunas muestras (En: Eshelman et al. 2003).

Los haplogrupos B, C y D han sido todos identificados en restos esqueléticos paleo-indios, sin embargo el miembro más antiguo del haplogrupo A (el haplogrupo más común en América del Norte y parte de América del Sur), data solo en 4,504 ±105 años AP. No obstante relativamente pocas muestras de paleo-indios han sido analizados y la mayoría de ellos proviene del oeste de los Estados Unidos, donde el haplogrupo A es raro en las poblaciones modernas, excepto a lo largo de la costa (Eshelman et al. 2003).

En casi todos los estudios de poblaciones norteamericanas antiguas, se han descubierto individuos que no parecen pertenecer a ninguno de los 5 linajes fundadores. En muchos casos esto es

indudablemente el resultado de una contaminación externa de las muestras que no contienen ADN o cuyo material genético está inhibido para su amplificación por PCR. Sin embargo, la posibilidad de encontrar haplogrupos adicionales en estudios de ADN en las Américas persiste. Tal linaje podría haberse extinguido o ser un linaje aún no descubierto al nivel de las poblaciones modernas, existiendo en frecuencias muy bajas (Eshelman et al. 2003). Por ejemplo, recientemente se reportaron dos individuos de aproximadamente 5000 años de antigüedad como pertenecientes al haplogupo M, ampliamente encontrado en Asia del Este pero por primera vez hallado en América (Malhi et al. 2007).

Consideraciones acerca de la degradación del ADN y de la contaminación de las muestras

Luego del entusiasmo inicial por las investigaciones con ADN surgieron observaciones fundamentales acerca de la naturaleza de la preservación del ADN, la alta tasa de fracaso de amplificación de muchas muestras y preocupaciones acerca de la autenticidad de las muestras (O'Rourke et al. 2000).

Existen dos obstáculos principales para la recuperación del ADN antiguo: la degradación molecular que limita la cantidad del ADN amplificable disponible y los inhibidores orgánicos de la PCR generalmente que se coextraen con el ADN. Los ácidos nucleicos se degradan gradualmente a lo largo del tiempo por medio de procesos como la hidrólisis y la oxidación. La hidrólisis es la rotura del enlace N-glicosilico entre el azúcar y la base en presencia de agua. La guanina y la adenina son 20 veces más susceptibles a la remoción (depurinación) que la citosina y la timina (depirimidación), aunque la tasa depende de la temperatura y del pH. Inversamente, la deaminación hidrolítica afecta a las pirimidinas (30,000 años de vida media *in vivo*) a una tasa 40 veces más alta que a las purinas (O'Rourke et al. 2000). La deaminación es particularmente rápida en el caso de la citosina, que resulta en la conversión de citosina en uracilo en el ADN. Cuando este ADN se utiliza como molde para una PCR, resultarán transiciones C→T y G→A, ya que cuando la polimerasa se encuentra con un residuo de desoxiuridina en la hebra molde, incorporará un residuo de desoxiadenosina, en lugar de uno de desoxiguanosina (Hofreiter et al. 2001).

La oxidación es el proceso por el cual los radicales hidroxilo o superóxido derivados del agua modifican las bases o distorsionan la hélice. Debido a que las mitocondrias son el centro del metabolismo del O₂, la oxidación afecta en mayor forma al genoma mitocondrial que al nuclear. Se sospecha que las hidantoínas (pirimidinas oxidadas) son las que más dañan el ADN. Su presencia se relaciona negativamente con el éxito de extracción y de amplificación del ADN, probablemente por el hecho que bloquean la extensión durante la PCR. Estos procesos de degradación ocurren constantemente *in vivo* (100-500/célula/día), pero en los núcleos están bajo un estricto control gracias a los mecanismos de reparación. Luego de la muerte, estos y otros procesos degenerativos continúan acumulándose. Por estas razones, la recuperación y la amplificación del ADN, cuando son posibles, están generalmente limitadas a fragmentos menores de 300-500 pares de bases de longitud y en muestras con una antigüedad de no más de algunas decenas de miles de años (O'Rourke et al. 2000).

La probabilidad de extraer ADN antiguo exitosamente está en relación con la edad de la muestra, sin embargo la edad no es el factor determinante para el éxito. Mucho más importante es el ambiente al que estuvo expuesta la muestra desde su muerte. La tasa de degradación del ADN se ve afectada por la temperatura del ambiente, la humedad y el pH del suelo si la muestra está enterrada. Además, el proceso de extracción del ADN frecuentemente coextrae sustancias químicas que inhiben la reacción de amplificación por PCR, dificultando el acceso al ADN que hubiera. Aunque este

problema puede ser tratado en cierta medida con modificaciones en las técnicas de extracción, altos niveles de tales inhibidores pueden representar un problema insalvable. Por lo tanto, el suelo en el cual la muestra arqueológica ha estado enterrada es importante tanto porque sus características pueden afectar la tasa de degradación del ADN como por los inhibidores que puedan depositarse en la muestra (Kaestle y Horsburgh 2002).

Debido a la sensibilidad de la PCR y la naturaleza degradada del ADN en las muestras antiguas, la contaminación de las mismas y de los reactivos por ADN exógeno es una preocupación constante. Dicha contaminación puede provenir de diversas fuentes, incluyendo el ADN de otras personas que hayan manipulado las muestras antes que llegaran al laboratorio, como pueden ser arqueólogos, personal de museo, trabajadores médicos. De todas formas, aún cuando todas las precauciones descritas para evitar la contaminación sean tomadas, ésta es una realidad inevitable cuando se trabaja con ADN. La habilidad del investigador consiste en identificar cuándo ocurre la contaminación. Los controles negativos se corren en paralelo con las muestras a lo largo del procedimiento de extracción, en el cual los tubos vacíos se tratan exactamente en la misma forma que los tubos que contienen muestras. Si los productos de esos controles negativos rinden ADN amplificable, es muy posible que la extracción haya sido contaminada. También se corren controles negativos de la PCR para asistir en la determinación del punto del procedimiento en el que ocurrió la contaminación. Una prueba más avanzada de contaminación es a nivel del análisis de las secuencias de ADN obtenidas de las muestras antiguas, las cuales se pueden comparar con las de las personas que manipularon las muestras en todo el proceso, desde su recuperación (Kaestle y Horsburgh 2002).

En este trabajo se secuenciaron segmentos de la HVRI de muestras de ADN de individuos hallados en territorio uruguayo (tanto del este como del oeste), de las que anteriormente no había sido posible obtener información sobre haplogrupos por medio de análisis por RFLP.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo fue esclarecer la situación de aquellos individuos prehistóricos hallados en territorio uruguayo de cuyos restos se extrajo ADN, que siendo analizado por RFLP no fue posible clasificar en ningún haplogrupo amerindio principal (A, B, C o D).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar la bibliografía al respecto que se ha publicado para América.
- Aprender las técnicas de extracción del ADN y de amplificación.
- Armar una base de datos que incluya los individuos que no presentaron los sitios de corte característicos de los haplogrupos A, B, C o D en el análisis por RFLP.
- Analizar las secuencias de la región hipervariable I de dichos individuos (de los sitios **CH2D01-A**, **CG14E01**, del este y **El Cerro**, **Colonia Concordia**, **Los Cardos 1**, **Los Cardos 2**, **Campo Morgan 15736**, del oeste) para intentar definir a qué haplogrupo pertenecen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se consultó bibliografía referente a poblamiento de América, tanto revisiones como trabajos específicos sobre distintas regiones, así como trabajos centrados en aspectos técnicos, para apoyar las tareas realizadas.

Inicialmente se analizaron 16 muestras que fueron seleccionadas del total de las muestras de ADN antiguo del territorio uruguayo por presentar problemas a la hora de asignarlas a alguno de los haplogrupos principales encontrados en América. En la tabla 2 se presentan todas ellas con los detalles de los resultados anteriores a este trabajo. Los sitios arqueológicos del territorio uruguayo donde se hallaron los individuos que se analizan en este trabajo se indican en la figura 2.

	Identificación	Muestra	RFLP							
			A	Fecha	B	Fecha	C	Fecha	D	Fecha
ESTE	CH2D01-A grupo óseo 4	2 molar sup izq	No	24/11/06	No Sí	12/01/05 31/07/07	No	29/04/04	No	24/11/06
	CH2D01-A grupo óseo 16	molar inf.	No	24/11/06	No	08/08/07	No	4/3/04	No	24/11/06
	CH2D01-A grupo óseo 17	molar inf.	No	24/11/07	No Sí No	24/11/06 31/07/07 10/08/07	No	4/3/04	No	18/01/08
	CG14E01 III esq 1	Premolar	No	1/12/04	No	08/08/07	No	24/11/06	No	24/11/06
	CG14E01 I-grupo óseo 9(A)	1 molar inf. Izq.	No	1/12/04	No No	23/11/04 30/07/07	No	4/3/04	No	9/6/05
	CG14E01 I- grupo óseo 9(B)	2 molar inf. Izq.			No	23/11/04	No	29/4/04	No	18/1/08
OESTE	El Cerro, esqueleto 1	1er metacarpo	No	17/1/08	No	22/8/07	No	5/11/04		
	El Cerro, esqueleto 2	2º molar sup. der.			No No	15/8/07 22/8/07	No	3/9/07		
	Colonia Concordia 41101	Metacarpo			No	8/8/07	No	3/9/07		
	Colonia Concordia 47996A	2º molar inf. der.	No	17/1/08	No	17/8/07				
	Cañada Saldaña - "Junto al 47996"	Molar	No	19/09/07	No	31/07/07			No	18/1/08
	Cañada Saldaña 51983	1er molar inf.			*					
	Colonia Concordia 55698	Metacarpo			*					
	Los Cardos 1	Falange pie			*				No	18/1/08
	Los Cardos 2	Metatarso	No	17/1/08	*					
Campo Morgan 15736	Metatarso	No	17/1/08	*				No	18/1/08	

Tabla 2: Muestras seleccionadas para analizar en la primera etapa, indicando los ensayos que se realizaron antes del presente trabajo y sus resultados. *: Sin resultados tras dos amplificaciones al 24/08/07

Las extracciones de ADN fueron realizadas previamente a este trabajo en distintos momentos, partiendo de huesos o dientes y utilizando un protocolo adaptado de fenol-cloroformo y proteinasa K con la utilización de una suspensión de sílice (modificado de Baron et al. 1996 y descrito sintéticamente por Merriwether et al. 2000 En: Figueiro 2006, ver Anexo).

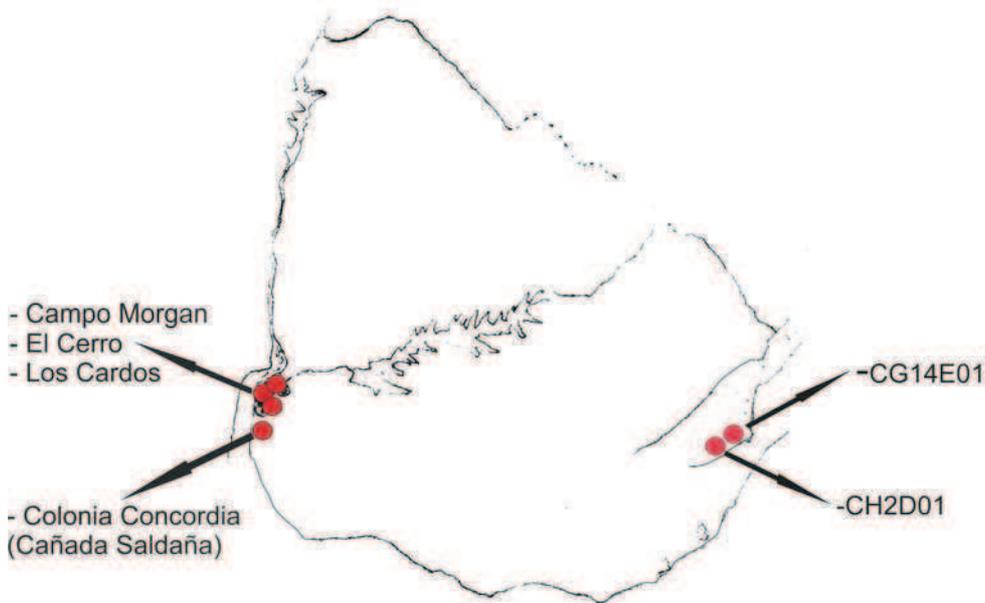


Figura 2. Mapa de Uruguay mostrando los sitios arqueológicos del este y del oeste.

La preparación de las reacciones de PCR se realizó en el laboratorio de ADN antiguo del Departamento de Antropología Biológica (Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación), con instrumental de uso exclusivo para minimizar el riesgo de contaminación. La amplificación por PCR del ADN mitocondrial se realizó en el mismo laboratorio. Debe señalarse que no se manipula ni guarda ADN moderno ni productos de PCR en las instalaciones de ADN antiguo.

La amplificación de la HVRI (16035-16410) se realizó utilizando 6 pares de cebadores que se superponen (se detallan en la tabla 3). Los segmentos de mayor valor diagnóstico para los haplogrupos amerindios principales son el HVR 2, HVR 3 y HVR 4, por lo cual es en los que se puso más énfasis a la hora de amplificar. A su vez, en los casos en que fue posible, se amplificaron dos segmentos juntos (HVR 2-3 o HVR 3-4) ya que de esta forma se pierde menos información al momento de secuenciar. Cuanto más degradado se encuentra el ADN menos probabilidades hay de encontrar segmentos largos.

Segmento	Primer F		Primer R		Largo de amplicón
	5'	3'	3'	5'	
HVR1 N	16015	16035	16096	16114	100
HVR 1	16036	16055	16139	16158	123
HVR 2	16112	16131	16218	16237	126
HVR 3	16192	16209	16303	16322	131
HVR 4	16268	16287	16356	16375	108
HVR 5	16327	16347	16410	16429	103

Tabla 3: Posiciones nucleotídicas de los cebadores para amplificar la HVR1. Tomado de Figueiro (2006)

Generalmente se trabajó con reacciones de 30 µl para las muestras a secuenciar. La mezcla de reacción consistió en el *buffer* provisto por el fabricante (20 mM Tris-HCl, 20 mM KCl y 5 mM (NH₄)₂SO₄), entre 1 y 2 mM de MgCl₂, 0,21 µM de cada cebador, 35 µM de dNTP y 10% (v/v) de dilución de ADN. En virtud de los potenciales factores inhibidores de la reacción de PCR en el extracto (taninos, ácidos húmicos y fúlvicos, productos de Maillard), así como el carácter inhibitor de la propia suspensión de sílice utilizada en el protocolo de extracción (O'Rourke et al. 2000), se utilizaron diluciones de 1:20 y 1:50 del extracto original en la reacción de PCR, con lo cual la concentración de extracto en la reacción fue de 1:200 o 1:500, según la dilución utilizada.

Las reacciones de PCR se efectuaron con *Taq* polimerasa diseñada para activarse a temperaturas mayores de 90°C (*Platinum Taq*, Invitrogen corp., o *Hotstart Taq*, Fermentas corp.). Si bien su fidelidad es equivalente a la *Taq* polimerasa común, el hecho de que inicie su actividad en forma brusca y con el ADN a replicar desnaturalizado minimiza la formación inespecífica de productos de partida, como ser los dímeros de cebadores (Figueiro 2006).

La amplificación de los fragmentos fue controlada por electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. En los casos en que en la mayoría de los blancos se observó alguna banda (aparte de los dímeros de primers) se procedió a descartar todos los tubos. Algunas de las muestras que rindieron ADN fueron purificadas mediante el Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (General Electric), siendo el kit de purificación que mostró más eficiencia y facilidad de implementación de los probados en este laboratorio. La secuenciación de las muestras se llevó a cabo en el Instituto Pasteur y en el laboratorio privado Macrogen (Corea). Se secuenció también el ADNmt de quienes manipularon las muestras, G.F. (Gonzalo Figueiro, a cargo del laboratorio de ADN antiguo), quien realizó las extracciones y algunas amplificaciones y A.L.C. (la propia), quien solo hizo amplificaciones, con el fin de identificar los casos de contaminación con ADN moderno. Las secuencias se alinearon utilizando el programa GeneDoc versión de marzo de 2007 (Nicholas et al. 1997) y fueron comparadas con la secuencia de referencia de Cambridge (rCRS) (revisión hecha por Andrews et al. 1999 de la secuencia original de Anderson et al. 1981). Las ambigüedades fueron resueltas mediante lectura directa del electroferograma utilizando el programa Chromas versión 1.45 (Technelysium Pty Ltd 2003-2009). Se analizaron las secuencias a fin de buscar mutaciones típicas de los haplogrupos amerindios principales A, B, C, D y X, y otras mutaciones.

El estudio se puede dividir en 2 etapas en función de las muestras analizadas y de las estrategias utilizadas. En la primera se analizaron las 16 muestras que aparecen en la Tabla 1, variando en algunos casos las concentraciones de Mg, así como del ADN y probando con diferentes *Taq* polimerasas para incrementar el rendimiento de las amplificaciones. Debido a que los resultados obtenidos en esta etapa no fueron muy positivos (ver Resultados) se buscaron algunas alternativas para mejorar los procedimientos. Una de ellas fue la implementación de la albúmina sérica bovina (BSA), con el fin de contrarrestar el efecto inhibitor sobre la *Taq* polimerasa de algunos contaminantes que co-purifican con el ADN, a una concentración de 6 µg/tubo (por sugerencia del Dr. Claudio Martínez y luego de revisar algunos protocolos de amplificación de ADN). El otro cambio de la segunda etapa fue el laboratorio al cual se eligió mandar las muestras a secuenciar, en este caso fue el laboratorio privado de Corea antes mencionado (Macrogen).

En un caso de contaminación de los blancos de la PCR, en la segunda etapa (17/11/08), se procedió a enviar a secuenciar el contenido de los mismos con el objetivo de determinar qué era lo que estaba contaminando.

Como forma de cuantificar los resultados de las amplificaciones en ambas etapas se contabilizaron los intentos de amplificación para cada segmento de cada muestra hasta obtenerse un resultado positivo. Luego se hizo un promedio por segmento, en el que participaron solo las muestras que se pudieron amplificar al final de cada etapa, las otras se descartaron del promedio. Por otro lado, se buscó la fracción de muestras que habían llegado a ser amplificadas para los diferentes segmentos, sin importar la cantidad de intentos realizados. Para evaluar la utilidad de la BSA se comparó la cantidad de intentos de amplificación para los segmentos 2-3 y 3-4, con BSA y sin BSA, utilizando el programa RxC, para el análisis de la contingencia de tablas (Miller 1997). Por otro lado se contabilizaron los éxitos (muestras que amplificaron sin importar la cantidad de intentos) y los fracasos (las que no amplificaron nunca) para los segmentos 2-3 y 3-4 por separado, utilizando el mismo programa para determinar la validez estadística de los resultados.

RESULTADOS

El éxito de amplificación en la primera etapa fue relativamente bajo (Ver Tabla 4). Para los segmentos más cortos (1, 2, 3 y 4) fueron necesarios, en promedio, menos intentos que para los largos (2-3 y 3-4) 1.17 contra 1.33, como era de esperarse. De los segmentos enviados a secuenciar al Instituto Pasteur se obtuvieron secuencias muy poco claras por lo cual se descartaron y no se analizarán aquí. Posiblemente el servicio de secuenciación no estuviera funcionando adecuadamente.

Muestra	Segmento	Cantidad de intentos de amplificación realizados hasta el primer éxito					
		1	2	3	4	2-3	3-4
CH2D01-A grupo óseo 4				2	2		2
CH2D01-A grupo óseo 16		1		2	1	1	X
CH2D01-A grupo óseo 17		X		X		1	2
CG14E01 III esq 1				1			1
CG14E01 I- grupo óseo 9 (A)		1		2	X	1	3
CG14E01 I- grupo óseo 9 (B)		1		2	2	1	X
El Cerro, esqueleto 1		X	X	1	1	1	X
El Cerro, esqueleto 2		X	1	X	2	X	X
Colonia Concordia 41101		X	1	2	1	1	X
Colonia Concordia 47996A		1	X	1	1	X	2
Cañada Saldaña - "Junto al 47996"		1		X	1	X	X
Cañada Saldaña 51983				X			1
Colonia Concordia 55698				1			1
Los Cardos 1		1	1	1	1	1	1
Los Cardos 2		1	1	1	1	1	X
Campo Morgan 15736		1	1	1	1	X	2
Promedio de intentos		1,00	1,00	1,42	1,27	1,00	1,67
Fracción de muestras que amplificaron sin importar la cantidad de intentos		0,69	0,75	0,75	0,92	0,69	0,56

Tabla 4: Resultados de las PCRs de la primera etapa, sin el uso de BSA. "X" se refiere a los casos en que los intentos realizados no fueron suficientes para amplificar una vez determinado segmento de una muestra y, por lo tanto, no fue posible amplificarlo.

En la Tabla 5 se muestran los resultados de amplificación de la segunda etapa, utilizando BSA. En este caso solamente se amplificaron los segmentos más largos: 2-3 y 3-4. Fueron necesarios menos intentos para amplificar el segmento 3-4, todas las muestras que amplificaron lo hicieron en el primer intento, mientras que sin BSA 4 muestras amplificaron en el primer intento, 4 en el segundo y 1 en el tercero ($p= 0,007$). Con respecto al segmento 2-3 todos las muestras que amplificaron lo hicieron en el primer intento, tanto con BSA como sin BSA. En la prueba de éxitos y fracasos los resultados estadísticos no fueron significativos.

Muestra	Segmento	Cantidad de intentos de amplificación realizados hasta el primer éxito	
		2-3	3-4
CH2D01-A grupo óseo 4		1	1
CH2D01-A grupo óseo 16		1	1
CH2D01-A grupo óseo 17		1	1
CG14E01 III esq 1		X	1
CG14E01 I- grupo óseo 9 (A)		X	1
El Cerro, esqueleto 1		1	X
El Cerro, esqueleto 2		1	1
Colonia Concordia 41101		X	1
Colonia Concordia 47996A		1	X
Cañada Saldaña - "Junto al 47996"		X	1
Cañada Saldaña 51983		X	1
Los Cardos 2		1	1
Promedio de intentos		1	1
Fracción de muestras que amplificaron sin importar la cantidad de intentos		0,62	0,85

Tabla 5: Resultados de las PCRs de la segunda etapa, incluyendo el uso de BSA. "X" se refiere a los casos en que los intentos realizados no fueron suficientes para amplificar una vez determinado segmento de una muestra y, por lo tanto, no fue posible amplificarlo.

	Sitio	Individuo	Cronología	Haplogrupo
Este	CH2D01 - A	3	1350 A.P.	B*
		18A		A*
		18B		C**
		19A	1700 A.P.	C**
		12		B**
		13A		C**
		20	1610 ± 46 A.P.***	C**
	CH2D01 - B	B-IV	1090 A.P.	C*
	CG14E01	3	1500 A.P.	B*
		4		B*
Puntas del San Luis	Subunidad II	1360 ± 100 A.P.***	A*	
Oeste	Colonia Concordia	37974	1840 A.P.	B*
		47994		B*
		47996		A*
	Arroyo Yaguareté	1	s/d	D*
	Campo Morgan	15736		C*
	Los Cardos	1		C*
El Cerro	2B	1910 ± 50 A.P.***	D*	

Tabla 6: Sitios, individuos y cronologías de los restos prehistóricos analizados a la fecha en las regiones este y oeste del Uruguay. (*) – Haplogrupo determinado por RFLP. (**) – Haplogrupo determinado por secuencia de la HVR I. Todas las cronologías son fechas *post quem* basadas en el contexto, excepto las marcadas (***), que son directas. Las dataciones están en años radiocarbónicos antes del presente. Tomado de Figueiro y Sans (2008).

Paralelamente, algunas de las muestras fueron sometidas nuevamente a análisis por RFLP, obteniendo de esta forma definiciones de haplogrupo para dos de las muestras incógnita de la primera etapa. Estas muestras son **Los Cardos 1** y **Campo Morgan 15736**, los que fueron diagnosticados positivamente como haplogrupo C (ver Tabla 6).

Colonia Concordia 55698 se descartó en este análisis porque luego de muchos intentos sin éxito de amplificación, se duda de que haya ADN endógeno.

Los segmentos amplificados en la segunda etapa que fueron mandados a Macrogen (Corea) para su secuenciación fueron los siguientes: HVR 3-4 de **CH2D01-A grupo óseo 4**, HVR 2-3 y HVR 3-4 de **CH2D01-A grupo óseo 16**, HVR 2-3 y HVR 3-4 de **CH2D01-A grupo óseo 17**, HVR 3-4 de **CG14E01 III esq 1**, HVR 2-3 y HVR 3-4 de **CG14E01 I- grupo óseo 9 (A)**, HVR 3-4 de **El Cerro, esqueleto 1**, HVR 2-3 y HVR 3-4 de **El Cerro, esqueleto 2**, HVR 2-3 y HVR 3-4 de **Colonia Concordia 41101**, HVR 3-4 de **Cañada Saldaña 51983** y HVR 3-4 de **Los Cardos 2**. De **Colonia Concordia 47996A** y de **Cañada Saldaña "Junto al 47996"** no se obtuvo la cantidad suficiente de ADN como para ser secuenciado. Las secuencias obtenidas fueron legibles en su mayoría. En la Tabla 7 se exponen las mutaciones observadas en dichas secuencias con respecto a la rCRS. Además se presentan las de G.F. y A.L.C. y la del blanco que se halló contaminado el día 17/11/08.

	amplificación		16000+												
	Segmento y hebra	fecha	111	189	212	217	223	224	259	274	278	290	291	311	519
rCRS	HVRI		C	T	A	T	C	T	C	G	C	C	C	T	T
G.F	HVRI		T	C	.	.	.	C	C	
A.L.C.	HVRI		C
CH2D01-A grupo óseo 4	3-4 R	17/11/08
CH2D01-A grupo óseo 16	3-4 R	17/11/08
	2-3 F	24/11/08	.	.	.	T	T
CH2D01-A grupo óseo 17	3-4 R	17/11/08	Y	Y	
	2-3 F	24/11/08
CG14E01 III esq 1	3-4 R	17/11/08	C	C	
CG14E01 I- grupo óseo 9 (A)	3-4 R	17/11/08	Y	
	2-3 F	24/11/08
El Cerro, esqueleto 1	2-3 F	1/12/08	.	.	.	T
El Cerro, esqueleto 2	3-4 R	17/11/08	.	.	C	.	.	.	A
	2-3 F	24/11/08	.	.	.	T
Colonia Concordia 41101	3-4 R	17/11/08	C	C	
	2-3 F	
Cañada Saldaña 51983	3-4 R	2/12/08	.	.	.	T	.	.	.	T	T	.	.	.	
Los Cardos 2	3-4 R	2/12/08	.	.	G	
Blanco "17/11/08"	3-4 R	17/11/08	.	.	.	T	.	T	.	.	T	.	.	.	

Tabla 7: Resultados de la secuenciación, se presentan como mutaciones con respecto a la rCRS (revisión hecha por Andrews et al. 1999 de la secuencia original de Anderson et al. 1981). Se detalla el segmento amplificado así como la hebra elegida para secuenciar (F es forward y R reverse). La fecha de las amplificaciones también se muestra. "Y": pirimidina (C o T).

En algunos casos fue necesario recurrir al electroferograma para resolver ambigüedades y en 3 de éstos fue imposible determinar de qué pirimidina se trataba. En la figura 3 se muestra el electroferograma de la región 16284-16316 de **CH2D01-A grupo óseo 17**, obtenida del segmento 3-4 R, comparándolo con el de referencia (**A.L.C.**, ya que en esta región su secuencia es idéntica a la rCRS). En la posición 291 el programa Chromas versión 1.45 asigna una T, sin embargo no se puede descartar la posibilidad de que sea C. En la posición 311 asigna tanto una C como una T.

En la secuencia de **CG14E01 I- grupo óseo 9 (A)** también existe una ambigüedad que no se pudo resolver mediante la observación del electroferograma (no se muestra), por lo cual se dejó como pirimidina.

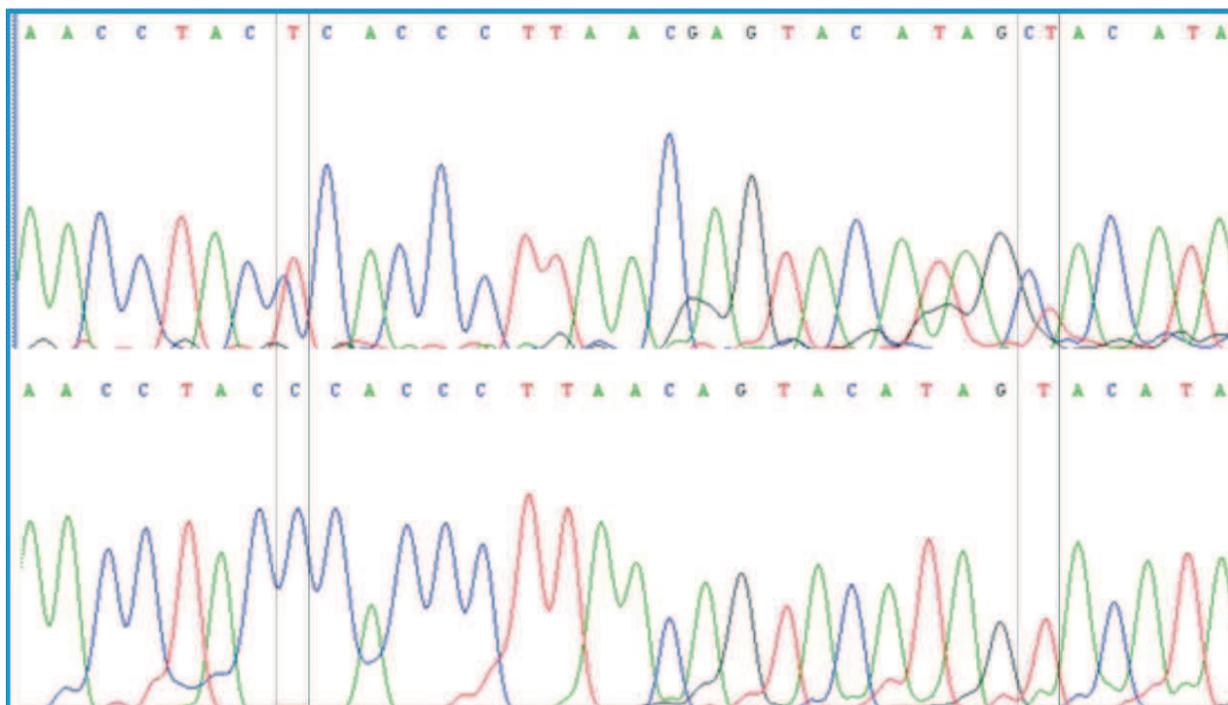


Figura 3. Electroferograma (programa Chromas versión 1.45) de la región 16284-16316 de **CH2D01-A grupo óseo 17**, obtenida del segmento 3-4 R (arriba), y de la A.L.C. (abajo) con las bases asignadas en cada posición. Las posiciones 291 y 311 se recuadran para mostrar las ambigüedades al momento de asignar las bases correspondientes.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La introducción de la BSA tuvo un rol importante en la mejora de la eficiencia de la amplificación para el segmento 3-4, con respecto a los intentos necesarios para llegar a la misma ($p=0,007$), lo cual confirma la utilidad de este reactivo en este caso. **Los Cardos 1** y **Campo Morgan 15736** son las muestras que menos problemas tuvieron a la hora de amplificar cualquiera de los segmentos (ver Tabla 4) y fueron las únicas 2 que se pudieron resolver por análisis de RFPL. Esto puede estar en relación con una mejor calidad del ADN presente e estas muestras.

Afortunadamente las secuencias de la HVRI de las dos personas que manipularon las muestras en el laboratorio (G.F y A.L.C.) no muestran mutaciones asignables a ningún haplogrupo amerindio, siendo G.F. haplogrupo K (con las mutaciones características 16111 C→T, 16189 T→C, 16224 T→C

y 16311 T→C) y A.L.C. haplogrupo H (con solo una mutación en la región determinada, que queda fuera de la HVRI en 16519 T→C, que igual es coherente con este haplogrupo). Este hecho hace posible determinar si contaminaron las muestras o no, en la mayoría de los casos. Para confirmar la contaminación proveniente de A.L.C. sería necesario estudiar la mutación 16519 en las muestras que no presentan mutaciones en los segmentos 2, 3 y 4 (esto aún no se puede hacer en el laboratorio por falta de los cebadores correspondientes). No obstante, existen algunos individuos de los analizados que pueden tener una antigüedad menor a los 400 años (es decir post-conquista), lo cual agrega la posibilidad de que posean un haplogrupo europeo.

El hecho de que una muestra sea perteneciente a un haplogrupo indígena no excluye por completo la contaminación, puede haber habido contaminación cruzada o “*carryover*”, consistente en el traspaso del ADN de una muestra al extracto de otra, con lo cual un ADN a primera vista endógeno sería el producto de la contaminación con el ADN de otra muestra (Figueiro 2006).

La muestra del **CH2D01-A grupo óseo 4** presenta una secuencia sin mutaciones con respecto a la rCRS para el segmento 3-4. Esto podría interpretarse como contaminación por el ADN de A.L.C. Sin embargo, esa no sería la única posibilidad ya que el individuo **CH2D01-A grupo óseo 4** es uno de los que podría plantear dudas sobre su cronología ya que podría ser post-conquista, y por lo tanto, no necesariamente indígena. El sitio CH2D01-A, presenta una cronología que abarca, si se consideran los fechados de capa, entre 2090 ± 90 y 340 ± 115 años AP (Bertoni et al. 2004). El esqueleto 4 estaba en la capa B, casi sobre el borde de la excavación inicial y a menos de 40 cm de la superficie del montículo (Fermenías et al 1996, Figura 4).

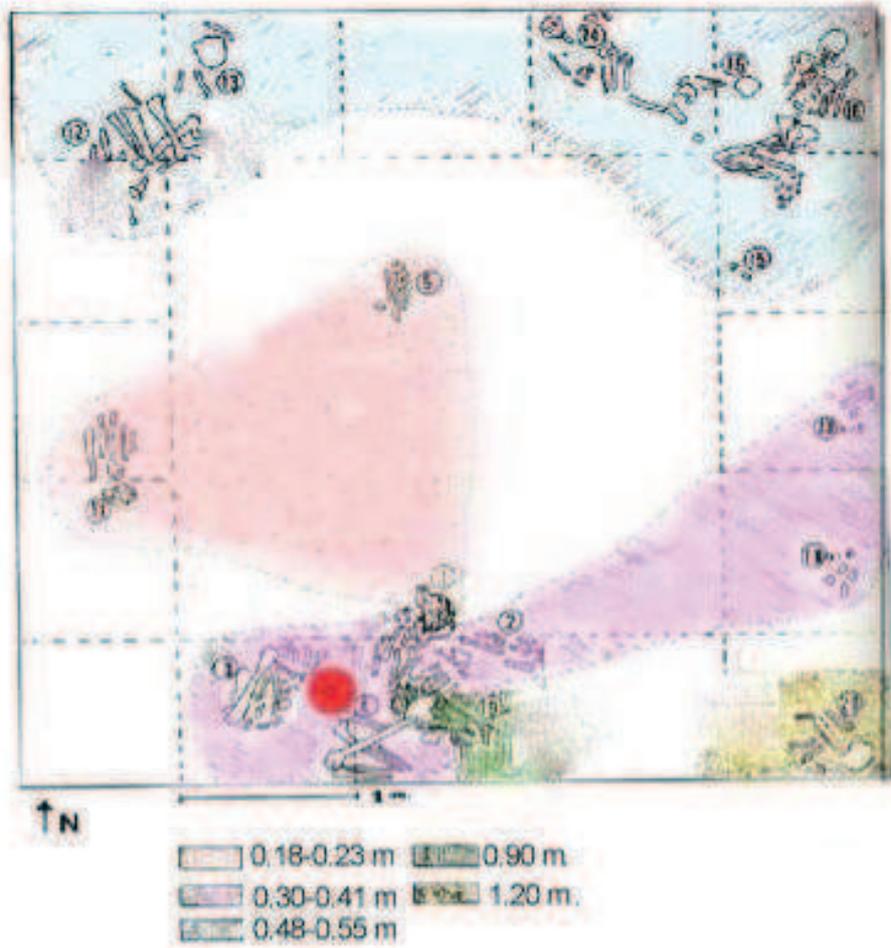


Figura 4. Plano de la excavación I del sitio CH2D01-A, indicando el esqueleto 4 con un punto (modificado de Fermenías et al 1995:508)

Del mismo sitio son las muestras **CH2D01-A grupo óseo 16** y **CH2D01-A grupo óseo 17**, pero ambas tienen una cronología que supera los 400 años de antigüedad, ya que se encuentran en capas más inferiores. Las 2 secuencias obtenidas del **CH2D01-A grupo óseo 16** muestran resultados muy diferentes: el segmento 3-4 no presenta mutaciones, mientras que el segmento 2-3 presenta 16223 C→T y 16290 C→T. La primera se puede interpretar como contaminación por A.L.C. y la segunda correspondería al haplogrupo A, descartándose la contaminación cruzada ya que de las muestras que se analizaron el mismo día (24/11/08) ninguna presenta esas mutaciones. Sin embargo, el análisis por RFLP del 24/11/06 resultó negativo para este haplogrupo (ver Tabla 2). En este caso se podría intentar hacer el análisis por RFLP otra vez o estudiar los sitios 16111 y 16319 para ver si presentan otras mutaciones típicas del haplogrupo A.

El caso del **CH2D01-A grupo óseo 17** plantea más dificultades ya que la secuencia del segmento 2-3, parece evidenciar contaminación por A.L.C. y la correspondiente al segmento 3-4 no muestra ningún haplogrupo amerindio (no presenta mutación en 16223 ni las características del haplogrupo B) pero tampoco se corresponde con ningún haplogrupo europeo conocido. En este caso sería necesario intentar amplificar estos segmentos nuevamente.

La secuencia del segmento 3-4 de la muestra **CG14E01 III esq 1** muestra claramente que hubo contaminación por parte G.F. (16224 T→C y 16311 T→C). Cabe la posibilidad de que el extracto del cual se partió para hacer la amplificación por PCR esté contaminado ya que la persona que realizó la amplificación de este segmento el día 17/11/08 fue A.L.C..

El sitio CG14E01 ("Isla Larga") tiene una cronología que abarca desde 3660 ± 120 (fechado de capa) hasta ca. 1600 DC (cuenta de vidrio europea), mientras que dos de los individuos fueron fechados en 830 y 850 ± 70 años AP (Cabrera et al. 2000; Cabrera y Marozzi 2001, En: Bertoni et al 2004). En el nivel más alto, donde se encontró una cuenta de vidrio (lo que asegura que es post-contacto europeo), se halló **CG14E01 I-grupo óseo 9 (A)** (Sans, comunicación personal 2009). El segmento 3-4 presenta solo una posible mutación en el sitio 16311, lo cual podría deberse a un evento contaminación por parte de G.F.. La secuencia del segmento 2-3 no presenta mutaciones pero es demasiado corta como para hacer algún diagnóstico. En principio no parece pertenecer a ningún haplogrupo amerindio, existiendo la posibilidad de que el ADN endógeno de este individuo sea europeo. Pero no se puede descartar la contaminación por parte de A.L.C. Para eliminar esa posibilidad habría que estudiar el sitio 16519.

El caso de **El Cerro, esqueleto 1** es bastante alentador ya que el único segmento secuenciado, 2-3, presenta una sola mutación en el sitio 16223, C→T, que puede corresponder al haplogrupo D, lo cual no se contradice con el análisis por RFLP (que no se hizo para dicho haplogrupo). Para confirmar este resultado se podría hacer el análisis por RFLP o secuenciar el segmento 5 para estudiar el sitio 16362.

El Cerro, esqueleto 2, al contrario que el esqueleto 1, plantea grandes problemas de interpretación, ya que las 2 secuencias con las que se cuenta son muy distintas y no parecen estar contaminadas ni por A.L.C ni por G.F.. Al realizar la búsqueda en bancos de datos (GenBank, EMBL) analizadas por el método BLAST de comparación de secuencias (Altschul et al. 1990, 1997) la secuencia del segmento 3-4 coincidió en un 100% con muchas secuencias, pero en pocos de los trabajos vinculados fue posible encontrar el haplogrupo asignado a dichas secuencias. Trejaut et al (2005) la ubican en el cluster del haplogrupo B, específicamente como haplotipo B4c1b. Esto significa un problema ya que por RFLP esta muestra se diagnosticó negativamente 2 veces para el haplogrupo B (ver Tabla 2). Por otro lado la secuencia del segmento 2-3 presenta solo la mutación

16223 C→T, que, como en el caso anterior podría corresponder al haplogrupo D. No se considera la contaminación cruzada porque las 2 amplificaciones (los segmentos 2-3 de **El Cerro, esqueleto 1** y **El Cerro, esqueleto 2**) se hicieron en días separados (1/12/08 y 24/11/08 respectivamente). Esta muestra continúa como incógnita ya que con los resultados obtenidos no es posible sacar ninguna conclusión. Se sugiere una nueva secuenciación de los segmentos 2, 3 y 4, así como el análisis por RFLP para el haplogrupo D.

En el caso de **Colonia Concordia 41101** se evidencia contaminación en las 2 secuencias, la del segmento 3-4 por parte de G.F. y la del segmento 2-3 por A.L.C. Sin embargo, ambas amplificaciones fueron realizadas por A.L.C..

Cañada Saldaña 51983 muestra mutaciones coherentes con el haplogrupo X, 16223 C→T, 16278 C→T y 16290 C→T según Pierron et al (2008). Sin embargo, dado que varios autores señalan que el haplogrupo X no se encuentra en América del Sur, es necesario seguir analizando esta muestra para confirmar dicho resultado. Para esto podría hacerse el análisis por RFLP para el haplogrupo X o secuenciar regiones del ADN mitocondrial que puedan tener mutaciones características para este haplogrupo, como los sitios 8913, 12397, 14502 y 16189 (Fagundes et al 2008).

Los Cardos 2 presenta una transición A→G en la posición 16212, para nada común, que no corresponde a ningún haplogrupo amerindio o europeo conocido. Al realizar la búsqueda en bancos de datos (GenBank, EMBL) analizadas por el método BLAST de comparación de secuencias (Altschul et al. 1990, 1997) algunas secuencias coinciden en un 100% con la incógnita pero en ninguno de los trabajos vinculados a dichas secuencias fue posible encontrar su asignación a algún haplogrupo. En Di Rienzo y Wilson (1991) se analiza un individuo sardo que presenta esta mutación, pero tampoco se le asigna haplogrupo. Lo mismo ocurre en el trabajo de Horai et al (1991), pero en este caso el individuo analizado es coreano y también presenta una mutación en la posición 16325. En otros trabajos que aparecen secuencias con la transición en la posición 16212, estas también poseen ciertas mutaciones características del haplogrupo A (como 16223 C→T y 16290 C→T) (Saillard 2000 y Shields 1993), lo cual indicaría que la transición 16212 A→G no es una mutación rara asociada a este haplogrupo. Igualmente el análisis por RFLP para el haplogrupo A dio negativo para esta muestra. En el futuro, podría intentarse amplificar otros segmentos de la región hipervariable para buscar otras mutaciones.

Con respecto al **Blanco "17/11/08"** es difícil determinar qué muestra fue la que lo contaminó ya que de las que se amplificaron ese mismo día ninguna presenta las mismas mutaciones. Aunque hay que tener en cuenta que una de las muestras que se intentó amplificar ese día, **Cañada Saldaña "junto al 47996"**, no se mandó secuenciar por mostrar una banda muy suave en el gel de agarosa. De esa muestra no se pudieron obtener secuencias, por lo cual no se puede saber si fue la que contaminó al blanco. Por otro lado, al analizar la secuencia del **Blanco "17/11/08"** por el método BLAST de comparación de secuencias (Altschul et al. 1990, 1997) en el banco de datos (GenBank, EMBL) no se encontró ninguna secuencia idéntica. Las mutaciones 16223 C→T y 16290 C→T son típicas del haplogrupo A pero la 16259 C→T no aparece asociada a las otras 2 en la bibliografía.

El hecho de que la secuencia encontrada en el **Blanco "17/11/08"** no se corresponda con ninguna de las correspondientes a ese día es positivo, desde el punto de vista de que la decisión de no descartar esas muestras amplificadas fue acertada. No obstante, se mantiene la curiosidad acerca de la fuente de contaminación del mismo.

No debe dejar de tenerse en cuenta la posibilidad de que se hayan generado mutaciones fantasmas, las cuales son artefactos sistemáticos generados en el curso del proceso mismo de secuenciación (Bandelt et al. 2002). El problema es que éstas parecen depender de las condiciones específicas del laboratorio de secuenciación y, por lo tanto, es imposible predecir un patrón universal de sitios más propensos a sufrir este tipo de mutaciones.

En resumen, de las 15 secuencias de las muestras incógnitas, 7 probablemente hayan sido contaminadas por los investigadores, 3 muestran mutaciones difícilmente asignables a algún haplogrupo conocido, 2 plantean una contradicción importante (por ser muy diferentes pero de la misma muestra) y solo 3 son coherentes con algunos de los haplogrupos amerindios. Estos números reafirman la idea que al trabajar con muestras antiguas la tasa de fracasos es muy alta.

Para los casos en los que se sospecha la presencia de ADN antiguo endógeno, los principales criterios de autenticidad propuestos en la literatura (Willerslev 2005) son: obtención de extracciones y amplificaciones independientes de una misma muestra, replicación de los resultados en un laboratorio independiente, cuantificación de secuencias específicas de ADN en los extractos por Real Time PCR, clonación bacteriana de las amplificaciones obtenidas y secuenciación de diferentes clones y estima de la preservación general de la muestra mediante la medida del grado de racemización del ácido aspártico. Sin embargo, en este trabajo solamente se cumplió el primero de estos criterios para algunos de los casos estudiados, ya que el laboratorio no posee actualmente los medios necesarios para realizar los otros procedimientos. Esto no quiere decir que los resultados obtenidos no sean válidos sino que pueden ser tomados como punto de partida para futuras investigaciones, incluyendo en las mismas más procedimientos que permitan comprobar la autenticidad del ADN antiguo.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul S F, Gish W, Miller W, Myers E W, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-415.
- Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D J (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**:3389-3402.
- Anderson S, Bankier A T, Barrell B G, de Bruijn M H L, Coulson A R, Droulin J, Eperon I C, Nierlich D P, Rose B A, Sanger F, Schreier P H, Smith A J H, Staden R, Young I G (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**:457-465
- Andrews R M, Kubacka I, Chinnery P F, Lightowlers R N, Turnbull D M, Howell N (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics* **23**:147
- Bandelt H J, Quintana-Murci L, Salas A, Macaulay V (2002) The fingerprint of phantom mutations in mitochondrial DNA data. *American Journal of Human Genetics* **71**:1150-1160
- Bertoni B, Figueiro G, Cabana G, McDonough J E, Bluteau C, Merriwether A, Sans M (2004) Primeras secuencias de ADN mitocondrial de indígenas prehistóricos del Uruguay. En L Beovide, I Barreto y C Curbelo (Eds.): X Congreso Uruguayo de Arqueología: La Arqueología Uruguaya ante los desafíos del nuevo siglo, Montevideo. CD-ROM Multimedia Didáctico (ISBN 9974-7811-0-8).
- DiRienzo A, Wilson A C (1991) Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **88**: 1597-1601
- Domínguez Aburto López J E, Huesca Hernández F (2007) Enfermedades de herencia mitocondrial que cursan con sordera. I. Antecedentes evolutivos y moleculares. *An Orl Mex* **52**:72-78
- Eshelman J A, Malhi R S, Smith D G (2003) Mitochondrial DNA Studies of Native Americans: Conceptions and Misconceptions of the Population Prehistory of the Americas. *Evolutionary Anthropology* **12**: 7-18
- Fagundes N J R, Kanitz R, Bonatto S L (2008) A Reevaluation of the Native American MtDNA Genome Diversity and Its Bearing on the Models of Early Colonization of Beringia. *PLoS ONE* **3**: e3157
- Femenías J M, Sans M, Portas M, Barreto I (1996) Enterramientos humanos en el Montículo CH2DO1, Departamento de Rocha, Uruguay. *Anais, VIII Reunião da Sociedade de Arqueologia Brasileira* **1**: 503-518, Porto Alegre.
- Figueiro G (2006) Estudio de las características y la continuidad de la población prehistórica de Arroyo Seco, Argentina, a través del ADN mitocondrial. Tesis para la obtención del grado de Magister. Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Área Biología, Subárea Genética. 129 pp
- Figueiro G, Sans M (2008) Este versus oeste: afinidades genéticas de las poblaciones prehistóricas del territorio uruguayo. IX Congreso de la Asociación Latinoamericana de Antropología Biológica, La Plata (póster no publicado)
- Heyer E, Zietkiewicz E, Rochowski A, Yotova V, Puymirat J, Labuda D (2001) Phylogenetic and Familial Estimates of Mitochondrial Substitution Rates: Study of Control Region Mutations in Deep-Rooting Pedigrees. *American Journal of Human Genetics*. **69**:1113-1126

- Hofreiter M, Jaenicke V, Serre D, von Haeseler A, Pääbo S (2001) DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Research* **29**:4793-4799
- Horai S, Hayasaka K (1990) Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *American Journal of Human Genetics*. **46**: 828-842
- Kaestle F A, Horsburgh K A (2002) Ancient DNA in Anthropology: Methods, Applications, and Ethics. *Yearbook of Physical Anthropology* **45**: 92-130.
- Malhi R S, Kemp B M, Eshleman J A, Cybulski J, Smith D G, Cousins S, Harry H (2007) Mitochondrial haplogroup M discovered in prehistoric North Americans. *Journal of Archaeological Science* **34**: 642-648.
- Meyer S, Weiss G, von Haeseler A (1999) Pattern of Nucleotide Substitution and Rate Heterogeneity in the Hypervariable Regions I and II of Human mtDNA. *Genetics*. **152**: 1103-1110
- Miller M P (1997) R x C: Program for the analysis of contingency tables.
<http://www.marksgeneticsoftware.net/rxc.htm>
- Nicholas K B, Nicholas H B Jr, Deerfield D W II (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW.NEWS* **4**:14 <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>
- O'Rourke D H, Hayes M G, Carlyle S W (2000) Ancient DNA Studies In Physical Anthropology. *Annual Review of Anthropology* **29**: 217-242
- Pierron D, Rocher C, Amati-Bonneau P, Reynier P, Martin-Négrier M-L, Allouche S, Batandier C, Mousson de Camaret B, Godinot C, Rotig A, Feldmann D, Bellanne-Chantelot C, Arveiler B, Pennarun E, Rossigno R, Crouzet M, Murail P, Thoraval D, Letellier T (2008) New evidence of a mitochondrial genetic background paradox: Impact of the J haplogroup on the A3243G mutation. *BMC Medical Genetics* **9**:41
- Saillard J, Forster P, Lynnerup N, Bandelt H J, Norby S (2000) MtDNA variation among Greenland Eskimos: the edge of the Beringian expansion. *American Journal of Human Genetics*. **67**: 718-726
- Salas A, Lareu V, Calafell F, Bertranpetit J, Carracedo A (2000). MtDNA hypervariable region II (HVII) sequences in human evolution studies. *European Journal of Human Genetics*, **8**: 964-974
- Schurr T G, Ballinger S W, Gan Y-Y, Hodge J A, Merriwether D A, Lawrence D N, Knowler W C, Weiss K M, Wallace D C (1990) Amerindian Mitochondrial DNAs have Rare Asian Mutations at High Frequencies, Suggesting They Derived from Four Primary Maternal Lineages. *American Journal of Human Genetics*. **46**: 613-623
- Shields G F, Schmiechen A M, Frazier B L, Redd A, Voevoda M I, Reed J K, Ward R H (1993) MtDNA sequences suggest a recent evolutionary divergence for Beringian and northern North American populations. *American Journal of Human Genetics*. **53**: 549-562
- Technelysium Pty Ltd 2003-2009, Chromas versión 1.45
- Trejaut JA, Kivisild T, Loo JH, Lee CL, He CL, Hsu CJ, Lee ZY, Lin M (2005) Traces of Archaic Mitochondrial Lineages Persist in Austronesian-Speaking Formosan Populations. *PLoS Biology* **3**: e247
- Willerslev E, Cooper A (2005) Ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society of London B* **272**:3-16

ANEXO

Protocolo de extracción de ADN (basado en Baron et al. 1996 En: Figueiro 2006)

DESCALCIFICACIÓN

Echar hasta 0,3 g de polvo en tubos etiquetados de 15 ml.
Agregar 2 ml 0.5M EDTA (pH 8.3).
Sellar con *parafilm*. Dejar agitando a temperatura ambiente por 72-96 horas.
Centrifugar 1 minuto a 700 rpm.

DIGESTIÓN CON PROTEINASA K*

Agregar 1.925 ml de agua.
Agregar 75 µl de Proteinasa K 20 mg/ml.
Agitar en *vortex* e incubar rotando 1.5 h a 60°C.

EXTRACCIÓN DEL ADN

Agregar un volumen de fenol/cloroformo/isoamil alcohol (~4 ml) a las muestras.
Mezclar lentamente por 10 minutos.
Centrifugar 3 minutos a 1500 rpm.
Transferir la fase acuosa de cada muestra a una alícuota de p/c/i (Normalmente la fase superior; agregar fenol o quedarse con ambas fases en caso de duda).**
Mezclar lentamente por 10 minutos.
Centrifugar 3 minutos a 1500 rpm.
Transferir la fase acuosa de cada muestra a una alícuota de cloroformo.
Mezclar lentamente por 10 minutos.
Centrifugar 3 minutos a 1500 rpm.

PRECIPITACIÓN DEL ADN

Transferir la fase acuosa de cada muestra a una alícuota de 80 µl de acetato de sodio y 3,3 ml de isopropanol (el pH del acetato de sodio ha de ser reducido a 4-4,5 con ácido clorhídrico; pH de la mezcla: 6,5-7,0)***
Mezclar por inversión durante 2 minutos.
Agregar 10 µl de suspensión de sílice (*glassmilk*).
Rotar lentamente durante 20 minutos a 55 °C.
Centrifugar 3 minutos a 700 rpm. Desechar líquido con cuidado, y volver a centrifugar si el *pellet* de *glassmilk* se desprende.
1) Agregar 4 ml de etanol 80% helado. Agitar en *vortex*.
2) Centrifugar 3 minutos a 700 rpm.
3) Volcar etanol con cuidado de que el *glassmilk* permanezca.
Repetir 1-3 una vez.
Colocar los tubos de lado y dejar secar en incubadora a 60 °C por 2 horas, o hasta que se haya evaporado el etanol.

ELUCIÓN

Agregar 125 µl TE. Agitar bien en *vortex*. Centrifugar a 750 rpm. Transferir

* A diferencia de otras proteasas, la proteinasa K no es inhibida por el EDTA utilizado en la descalcificación.

** Siendo un ácido, el ADN permanece disuelto en la fase acuosa, en tanto que otros compuestos generalmente hallados en el tejido y el sedimento permanecen en la fase orgánica.

*** Hänni et al. (1995) sugieren el uso de isopropanol en la primera precipitación dado que tiene una supuesta mayor selectividad por el ADN. Asimismo, Poinar et al. (1998) indican que el isopropanol es más eficiente a la hora de quitar el soluto de color amarillado atribuido a productos de Maillard, y que inhiben fuertemente la PCR.

**** La suspensión de sílice es un paso adicional en la eliminación de coextractos potencialmente inhibidores de la reacción de PCR, pero es a su vez un inhibidor.

TESINA DE GRADO DE LA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA HUMANA

**“ESTUDIO DEL DAÑO DEL ADN
ESPERMÁTICO EN PACIENTES
INFÉRTILES”**

Gianni Curti

Diciembre de 2010

Estudio del Daño del ADN Espermático en Pacientes Infértiles

RESUMEN

Se diagnostica infertilidad conyugal a una pareja que lleva buscando sin éxito el embarazo por un período de al menos doce meses. Se ha estimado que este tipo de trastornos afecta aproximadamente al 15% de las parejas en edad reproductiva, y que en alrededor del 50% de los casos de infertilidad conyugal subyace un factor masculino. El daño en el ADN espermático se relaciona con la fertilidad del varón, asociándose con tasas de fecundación disminuidas *in vivo* e *in vitro*, con deficiencias en el desarrollo del embrión pre-implantatorio y con tasas de aborto aumentadas. Existen varias técnicas de selección de espermatozoides y varios métodos para evaluar la fragmentación del ADN espermático en una muestra seminal. Sin embargo, no todos se aplican cotidianamente en la clínica ya sea por su elevado costo, por la falta de estudios que avalen su utilidad y su inocuidad, o porque no existe un consenso para la interpretación del resultado que cada técnica arroja y su relación con la infertilidad. Intentando contribuir con la solución de estas carencias, el objetivo de este estudio fue analizar el uso de diversas técnicas de detección de daño del ADN espermático en una población de hombres infértiles correlacionándolas con los parámetros del espermograma clásico. Además nos propusimos comprobar si la combinación de las técnicas de selección de espermatozoides *swim-up* y MACS-Anexina-V (del inglés: *Magnetic Activated Cell Sorting*), puede mejorar la calidad de una muestra espermática. Se analizaron dos pruebas de detección de daño del ADN espermático: el test de naranja de acridina (NA), que detecta roturas en las moléculas de ADN y el test de dispersión de la cromatina (SCD, del inglés: *Sperm Chromatin Dispersion*), que se basa en la decondensación diferencial de la cromatina nativa y fragmentada para evidenciar daño en el ADN. Se encontró que el test SCD concuerda mejor que el test NA con los parámetros del espermograma clásico relacionados con la capacidad fecundante del espermatozoide (morfología y motilidad espermática). En adición a estos test, también se evaluaron dos protocolos de selección espermática, uno simple y comúnmente usado (*swim-up* convencional) y otro más complejo y en etapa de experimentación (MACS-Anexina-V). Se halló que el *swim-up* convencional disminuye significativamente el porcentaje de espermatozoides con daño en su ADN de $27,79 \pm 12,95\%$ a $11,00 \pm 7,53\%$ ($P < 0,0001$). Consistentemente, tras la separación por *swim-up*, muestras con índices de fragmentación basales más elevados presentan una disminución del porcentaje de espermatozoides con ADN dañado más notable que aquellas con índices de fragmentación basales más pequeños, ya que los resultados del test SCD basal se correlacionan directamente con la variación del porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado ($r=0,815$; $P < 0,0001$; siendo r el coeficiente de correlación de Pearson). El daño en el ADN de los espermatozoides tiende a aumentar conforme avanza la edad del paciente luego del procesamiento del semen por *swim-up* ($r=0,361$; $P < 0,05$). De acuerdo a nuestros resultados, la aplicación de MACS-Anexina-V en combinación con la técnica de *swim-up* mejora la obtención de espermatozoides móviles progresivos (de $74,75 \pm 7,54\%$ a $85,50 \pm 7,33\%$), y morfológicamente normales (de $4,50 \pm 2,52\%$ a $7,00 \pm 1,41\%$). Dicha combinación de técnicas mejoró también las características ultraestructurales de los espermatozoides evaluadas por microscopía electrónica de transmisión (MET) (de $11 \pm 2,65\%$ a $22,67 \pm 0,58\%$ de cabezas

normales), y disminuyó los índices de fragmentación del ADN espermático (de $21,50 \pm 6,61\%$ a $2,50 \pm 2,65\%$ de espermatozoides con daño en su ADN). Sin embargo los resultados obtenidos indican que la mejora significativa de la mayor parte de los parámetros evaluados está dada por el *swim-up* y no por la separación magnética. Esto indica que el *swim-up* convencional parece ser una excelente técnica de selección *per se*, no siendo necesarias metodologías adicionales sofisticadas y/o costosas como la separación magnética, para mejorar la calidad de una muestra espermática.

INTRODUCCIÓN

Se ha estimado que aproximadamente un 15% de las parejas que intenta concebir por un periodo de doce meses o más no alcanza su objetivo (Dey, 2010), lo que se denomina infertilidad conyugal. Si bien generalmente no atenta contra la vida de los individuos de la pareja, la infertilidad conyugal produce importantes daños psicológicos a sus integrantes, muchas veces llevándolos a tratamientos largos y costosos, no siempre obteniendo resultados acordes. Al evaluar los posibles orígenes de la infertilidad de la pareja, aproximadamente un 30% de las causas responden al factor masculino por sí solo, con un 20% adicional que corresponde a factores masculinos en combinación con causas de origen femenino. Teniendo en cuenta estos datos, la incidencia del factor masculino en la infertilidad conyugal asciende a más de un 50 % (Ferlin *et al.*, 2007).

El análisis del semen es la prueba más importante en el inicio del diagnóstico de infertilidad masculina y debe ser necesariamente realizado por técnicos entrenados para asegurar la confiabilidad de los resultados (Menkveld, 2007; WHO, 2000). Un espermograma básico completo debe incluir un análisis físico o macroscópico en donde se evalúe el volumen de la muestra, su pH, su olor y color, su viscosidad y su licuefacción; y un estudio microscópico que tenga en cuenta el recuento y la concentración de espermatozoides, su motilidad, su morfología y su vitalidad, además de la presencia de otras células en el eyaculado discriminando entre leucocitos, células de la progenie espermática y células epiteliales. Para la correcta interpretación del resultado, el espermograma debe contener la información referente a la obtención de la muestra y al tiempo de abstinencia sexual previo a la obtención. (revisado en Menkveld, 2007; WHO, 1999; WHO, 2010).

Sea con fines diagnósticos, para la realización de diferentes ensayos, o como requisito previo para la realización de cualquier técnica de reproducción asistida, la muestra de semen debe ser procesada. La preparación del semen tiene como finalidad:

- separar a los espermatozoides del plasma seminal;
- aislar los espermatozoides móviles de los inmóviles, de los espermatozoides muertos, y de las demás células presentes en el eyaculado;
- aportar un medio de cultivo cuya composición apoye la homeostasis del espermatozoide (revisado en Sánchez *et al.*, 2009; WHO, 2010).

Existen varios métodos de preparación del semen con distintos niveles de complejidad. El procesamiento de una muestra por dilución y lavado es la estrategia más simple y se recomienda su aplicación en la preparación de muestras normozoospermicas¹ para inseminación artificial intra-uterina (IAIU) (WHO, 2010). Masivamente utilizada en los laboratorios de reproducción

¹ Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se dice que una muestra es *normozoospermica* cuando la concentración (o el número total) de espermatozoides, el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales, igualan o superan los límites inferiores de los rangos de referencia (WHO, 2010).

asistida es la técnica de separación de espermatozoides mediante gradiente de densidad, que consiste en la colocación de una alícuota de semen sobre una columna líquida compuesta por la superposición de capas de soluciones con densidades crecientes. La centrifugación de estas preparaciones hace que las células migren hasta su punto isopícnico (del griego *picnos* = denso) (Arangino y Del Giacco, 1995). Los espermatozoides maduros por ser células compactas alcanzan la capa de mayor densidad y sedimentan en el fondo del tubo de donde pueden ser fácilmente recogidos (Sánchez *et al.*, 2009). También muy utilizadas son las técnicas de migración o *swim-up* que se basan en el movimiento propio de los espermatozoides desde el semen al medio de cultivo. El *swim-up* directo se realiza colocando una capa de medio de cultivo sobre una alícuota de semen. Dicha capa es recogida luego de incubar la preparación para permitir la migración hacia ella de los espermatozoides (Sánchez *et al.*, 2009; WHO, 2010). La técnica *swim-up* convencional difiere de la anterior en que el semen es lavado una o dos veces por dilución y centrifugación antes de colocar la capa de medio de cultivo, que en este caso se deposita sobre el *pellet* celular (Sánchez *et al.*, 2009). La última edición del manual de la OMS recomienda el uso del *swim-up* directo en muestras cuya motilidad espermática esté disminuida y los parámetros recuento y concentración no se alejen de los rangos de normalidad. Esto se debe a que la cantidad de espermatozoides recuperada por *swim-up* es baja en comparación con el rendimiento de otras técnicas. Los gradientes de densidad están recomendados para muestras con bajo recuento, bajo porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales, o motilidad espermática comprometida (WHO, 2010). Pese a que en dicho manual no se aconseja realizar lavados previos al *swim-up*, la realización de estos lavados garantiza la separación del plasma seminal con todos sus posibles componentes infecciosos, por lo que el *swim-up* convencional sigue siendo la técnica de elección de muchos laboratorios (Bjorndahl *et al.*, 2005).

El factor masculino se relaciona directamente con la capacidad fecundante del espermatozoide y para evaluarla los parámetros del espermograma básico no son suficientes. A partir de un espermograma alterado es posible diagnosticar “infertilidad masculina”, pero salvo particulares excepciones, las anomalías detectadas en el espermograma no refieren a la etiología o al origen fisiopatológico de la infertilidad (Oehninger *et al.*, 2000). El desconocimiento de esto último lleva a dificultades en el manejo clínico del paciente que pueden resultar en “sobre-tratamiento” o “sub-tratamiento”, pudiendo una pareja padecer infertilidad aun cuando el espermograma no presente alteraciones. Es así que en la mayoría de los casos se hace necesaria una segunda instancia de pesquisa en el esquema de diagnóstico que vaya más allá de los parámetros “básicos” del espermograma. Si bien es cierto que el parámetro que mejor se ha correlacionado con la capacidad fecundante del espermatozoide, tanto *in vivo* como *in vitro*, es la morfología espermática siguiendo los criterios estrictos de análisis de espermatozoides (criterio estricto de Tygerberg)² (Kruger *et al.*, 1986; Donnelly *et al.*, 1998; Coetzee y Kruger, 2007; Kruger y Franken, 2004; Ombelet *et al.*, 1997), se han desarrollado otros ensayos que apuntan a la evaluación de la funcionalidad del gameto masculino y sus resultados también se han correlacionado en mayor o menor medida con la fertilidad del varón (Oehninger *et al.*, 2007). La mayor parte de ellos no se han incluido aún en el estudio seminal de rutina y son considerados por la OMS como procedimientos opcionales o de experimentación (WHO, 2010).

Existen varios test para el estudio de la interacción entre los espermatozoides y el mucus cervical, como el clásico *test post-coital* desarrollado para determinar el número de espermatozoides activos en la muestra de mucus, así como su comportamiento y sobrevivencia a distintos tiempos post-coito (WHO, 2010). Todos presentan el inconveniente de la introducción

² En lo que sigue de éste trabajo cuando se hable de morfología espermática, y salvo que se especifique que se trata de la morfología ultraestructural, se estará haciendo referencia a este criterio de clasificación morfológica.

del mucus, de composición y características extremadamente variables, por lo que el valor pronóstico de estos ensayos es discutido (van der Steeg *et al.*, 2004). Analizando la interacción espermatozoide-ovocito el *test de hemizona* consiste en la incubación de una cantidad estandarizada de espermatozoides junto con la mitad de una zona pelúcida microdisecionada, seguida de un recuento de los espermatozoides adheridos a la cara externa de la hemizona (WHO, 2010; Oehninger *et al.*, 2007). Este test presenta alta especificidad y sensibilidad, así como un alto valor predictivo para resultados de fertilización *in vitro* (Oehninger *et al.*, 2000), pese a ello está limitado al acceso no siempre sencillo a zonas pelúcidas y al equipamiento para seccionarlas. Otra prueba funcional que presenta buen valor pronóstico para resultados de fertilización *in vitro* es la evaluación de la reacción acrosómica inducida con ionóforos de calcio, fluido folicular, pentoxifilina, o por disminución de la temperatura; pero los valores de corte no son del todo claros y cambian según el método de inducción y la estrategia de visualización que se utilice. Además la especificidad de este tipo de pruebas es generalmente baja (Oehninger *et al.*, 2000). El *ensayo de penetración espermática* o *test de hámster* se utiliza para estudiar la penetración de los espermatozoides del paciente en ovocitos de hámster desprovistos de su zona pelúcida. Si bien no hay un valor de corte consenso y la tasa de resultados falsos positivos que arroja es muy alta (Oehninger *et al.*, 2000), este test provee información sobre la naturaleza fusiónica de las membranas de la cabeza de los espermatozoides capacitados (WHO, 2010). El avance en la tecnología de los sistemas computarizados de análisis de espermatozoides (CASA, del inglés: *computer-aided sperm analysis*) permite cada vez con mayor confiabilidad, recabar datos acerca de las características cinemáticas de los espermatozoides (WHO, 2010). Pese a que por tratarse de un sistema automatizado elimina el error introducido por la subjetividad del ojo humano, los controles de calidad, la calibración del equipo, y el constante monitoreo del mismo, son requisitos necesarios para la confiabilidad de la información que el sistema brinda. Además el costo del equipamiento limita la accesibilidad de la técnica, siendo aún discutible la relación costo-beneficio teniendo en cuenta el valor pronóstico de sus resultados para con los resultados obtenidos con las técnicas de reproducción asistida (TRA) (Oehninger *et al.*, 2007). Recientemente se ha visto que el daño en el ADN de los espermatozoides está directamente correlacionado con la capacidad fecundante de dichas células tanto *in vivo* como *in vitro* (Spano *et al.*, 2000; Evenson *et al.*, 2002). Asimismo, el índice de fragmentación del ADN espermático se mantendría más constante a lo largo del tiempo respecto a otros parámetros seminales comúnmente evaluados (Zini *et al.*, 2001). Además, la integridad del ADN espermático se asocia con un posterior desarrollo embrionario normal (Aitken, 2006).

En el proceso de fecundación el espermatozoide provee al ovocito de un juego cromosómico haploide para así restaurar la condición diploide necesaria para el normal inicio del desarrollo del cigoto. Es crucial entonces que el material genético se transfiera íntegro e intacto desde el espermatozoide al ovocito. Sin embargo, en el análisis de cualquier muestra de semen y especialmente en el semen humano, se encontrará con mayor o menor frecuencia, espermatozoides que presentan su ADN fragmentado (Gosálvez *et al.*, 2006).

El daño en el ADN de las células germinales masculinas se asocia con tasas de fertilización disminuidas tanto en condiciones normales como cuando se aplican TRA como IAIU o fertilización *in vitro* (FIV). Se ha comprobado que el porcentaje de espermatozoides con daño en su ADN se relaciona con la aparición de deficiencias durante el desarrollo del embrión pre-implantatorio y con un aumento de las tasas de aborto (Sakkas *et al.*, 1998; Aitken y Krausz, 2001; Duran *et al.*, 2002; Benchaib *et al.*, 2003; Bungum *et al.*, 2004; Zini y Libman, 2006). La descendencia de pacientes con elevados niveles de daño en el ADN de sus espermatozoides, presenta una mayor incidencia de enfermedades genéticas dominantes, infertilidad y cáncer

cuando se compara con la descendencia de individuos con niveles normales de daño en el ADN espermático (Aitken y Krausz, 2001; Aitken *et al.*, 2004).

Se ha intentado establecer el o los orígenes del daño en el ADN del espermatozoide. De las múltiples teorías generadas, tres parecen ser las más convincentes: (1) estrés oxidativo generado por un desbalance entre la producción de especies oxígeno-reactivas por parte de espermatozoides y leucocitos y la actividad antioxidante del plasma seminal, (2) alteraciones en el empaquetamiento de la cromatina dadas por una actividad alterada de la enzima topoisomerasa II durante el reemplazo de histonas por protaminas en el proceso de maduración espermática, y (3) "apoptosis abortiva", esto es, eventos apoptóticos que normalmente ocurren durante la espermatogénesis, se descontrolan por razones que aún se desconocen, arrojando en el eyaculado espermatozoides que han entrado en la vía apoptótica (Tarozzi *et al.*, 2007). Por otro lado la exposición a contaminantes xenobióticos ingeridos durante la alimentación, la ingesta de ciertos fármacos, las infecciones en el tracto genital asociadas con leucocitospermia, los episodios de fiebres altas, una temperatura testicular elevada, o una edad avanzada, pueden ser factores que contribuyan al daño observado en el ADN espermático (Aitken y De Iuliis, 2007; Gosálvez *et al.*, 2006).

Diversos métodos se han desarrollado con el objetivo de detectar daño en el ADN de los espermatozoides, intentando correlacionar los resultados de los distintos test con la infertilidad masculina, existiendo ventajas y desventajas en cada uno (Evenson *et al.*, 2002). En nuestro país alguno de ellos ha sido incluido en los protocolos de diagnóstico, pero no existen estudios de los beneficios que esto pueda implicar en nuestra población.

Para estudiar la fragmentación del ADN espermático se pueden utilizar básicamente dos estrategias:

1. Estudiar la capacidad diferencial que presenta la cromatina y en particular el ADN, para desnaturalizarse frente a determinados tratamientos. Dentro de esta táctica se pueden utilizar técnicas tales como el *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA; Evenson *et al.*, 1999), el *DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization* (DBD-FISH; Fernández *et al.*, 2000), el ensayo cometa bajo condiciones desnaturalizantes (Singh *et al.*, 1988) y el test *Sperm Chromatin Dispersion* (Fernández *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2005).
2. Marcar las roturas en la hebra de ADN incorporando moléculas trazadoras en ciertos extremos de la rotura. Para ello es posible servirse de técnicas con procesos enzimáticos para la incorporación *in situ* de nucleótidos marcados, tales como la *Terminal dUTP Nick-End Labeling* (TUNEL; Lopes *et al.*, 1998) o la *In Situ Nick Translation* (ISNT; Gorczyca *et al.*, 1993); o incorporar agentes como el naranja de acridina que permiten diferenciar cuando se intercalan en una molécula de ADN intacta o cuando lo hacen en una dañada (test de Naranja de Acridina, NA; Hurst y Roy, 1985).

Entre los test más utilizados para la evaluación del nivel de fragmentación del ADN espermático en el semen humano, el **SCD** se destaca por su fácil y rápida aplicación, la estabilidad en la lectura de los resultados y la posibilidad de detectar diferentes niveles de daño en el ADN del espermatozoide (Gosálvez *et al.*, 2006). El test se basa en la inducción de una decondensación diferencial de la cromatina entre aquellos espermatozoides que presentan su ADN fragmentado con respecto a aquellos que lo mantienen intacto. El ADN del espermatozoide se encuentra unas seis veces más compactado que el del cromosoma mitótico y organizado en bucles de menor

tamaño que los de las células somáticas, anclados a la matriz nuclear. Dichos bucles se compactan por la acción de las protaminas que estabilizan rígidamente la estructura a través de la formación de puentes disulfuro entre ellas. Si se rompen estos enlaces y se usa una solución específica de lisis para extraer proteínas, los bucles de ADN se relajan constituyendo halos alrededor de la estructura nuclear central residual y si se realiza un tratamiento desnaturizante ácido, aquellos espermatozoides que presentan su ADN fragmentado no liberan bucles de ADN y no generan halo de dispersión de cromatina, o si lo hacen éste es de muy pequeño tamaño. Por el contrario los espermatozoides sin fragmentación en su ADN generan amplios halos de dispersión de los bucles de cromatina (Gosálvez *et al.*, 2006). La discriminación visual directa es muy clara y evidente. Con ello presente se realiza el recuento en la muestra y se calcula el índice de fragmentación del ADN, expresándose como el porcentaje de espermatozoides con ADN dañado en la muestra (Gosálvez *et al.*, 2006).

El **test de Naranja de Acridina** se basa en la naturaleza metacromática de este colorante que intercalándose en el ADN doble hebra (nativo) en forma de monómero, emite fluorescencia verde, mientras que cuando se asocia con hebras simples de ADN (desnaturizado o extremos de roturas) forma un agregado que emite fluorescencia roja-anaranjada. El resultado del test se informa como el porcentaje de espermatozoides con fluorescencia verde sobre el total de espermatozoides evaluados (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007; Shamsi *et al.*, 2008; Eggert-Kruse *et al.*, 1996). Chohan y cols. (2008) realizaron un estudio comparativo de técnicas de detección de daño en el ADN espermático. En dicho trabajo hallaron que el test NA arrojaba índices de fragmentación del ADN espermático significativamente más altos que los demás ensayos testeados. Asimismo no encontraron correlación entre los resultados del test NA y los resultados de las demás pruebas (entre ellas el test SCD), tanto en pacientes infértiles como en los controles fértiles, y atribuyen esto a la escasa reproducibilidad del resultado del test NA.

La interpretación de los diversos test utilizados debería por un lado ser capaz de identificar pacientes con dificultad para concebir pero también establecer opciones terapéuticas. Dichas opciones para individuos con elevados índices de fragmentación del ADN espermático no son muchas, sus beneficios no son del todo claros o convincentes y dada su reciente aparición la mayoría se encuentra en etapa de experimentación (Aitken *et al.*, 2008).

Aitken y colaboradores clasifican las estrategias terapéuticas existentes en dos grandes grupos; un primer grupo engloba a todas las técnicas que tras una selección logran aislar sólo espermatozoides con bajos niveles de daño en su ADN, mientras que el segundo consiste en los tratamientos con antioxidantes (Aitken *et al.*, 2008).

La selección de espermatozoides sin daño en su ADN a partir de una muestra con elevado índice de fragmentación para su uso en TRA es indirecta. Esto es, son seleccionados en base a otro criterio (migración electroforética, un marcador de membrana, características morfológicas, etc.) y se infiere que el daño en su ADN y ese criterio están positivamente correlacionados.

En 2006 se reportó el uso de un procedimiento de separación celular mediante columnas magnéticas empleando como conjugado la molécula de Anexina-V, como posible método de separación de espermatozoides en la práctica clínica (*Magnetic Activated Cell Sorting*, MACS-Anexina-V; Said *et al.*, 2006). La anexina-V es una proteína de unión a fosfolípidos que tiene alta afinidad por la fosfatidilserina. Esta última normalmente se encuentra en la cara interna de la bicapa fosfolipídica que constituye la membrana celular. La externalización de la fosfatidilserina hacia la cara externa de la bicapa es uno de los primeros eventos que ocurren cuando una célula entra en proceso de muerte programada (apoptosis). En este fenómeno reportado en

espermatozoides humanos (Barroso *et al.*, 2000; Weng *et al.*, 2002) se basó la idea de conjugar esferas submicroscópicas superparamagnéticas con anexina-V e incubar muestras procesadas de semen humano con ellas, para luego hacer pasar esta suspensión por una columna sometida a un fuerte campo magnético, de manera que aquellos espermatozoides que hayan adherido microesferas a su membrana queden retenidos en la columna, separándolos así de los espermatozoides no apoptóticos que fluyen a través de la columna (Said *et al.*, 2005). Se vio que la suspensión con los espermatozoides que fluían libremente a través de la columna presentaba índices de fragmentación del ADN espermático significativamente menores que los niveles hallados en la muestra antes de la separación (Said *et al.*, 2006). Se demostró además que la aplicación de esta estrategia de selección aumenta la proporción de espermatozoides capaces de fecundar (Said *et al.*, 2008b). Pese a que la técnica continúa en fase de experimentación se ha publicado recientemente su utilización como complemento en TRA para el tratamiento de pacientes con elevados índices de fragmentación del ADN espermático (Dirican *et al.*, 2008). El nacimiento del primer niño sano concebido mediante MACS-Anexina-V se publicó a principios de 2010 (Rawe *et al.*, 2010).

Recapitulando, el factor masculino está presente en alrededor del 50% de los casos de infertilidad conyugal, y los parámetros evaluados en el espermograma clásico no siempre son suficientes para lograr un diagnóstico preciso. Además el daño en el ADN espermático, impacta negativamente en los resultados de TRA relacionándose con infertilidad y pudiendo explicar muchos casos de infertilidad idiopática. Existen varios métodos de detección de fragmentación del ADN espermático. También son varias las opciones terapéuticas disponibles para pacientes con elevados índices de fragmentación y aún no hay consenso sobre un algoritmo de diagnóstico y tratamiento para estos pacientes. Teniendo en cuenta todo lo anterior y que en nuestra población no existen estudios dentro de ésta línea, es que se plantean los objetivos que a continuación se detallan.

OBJETIVO GENERAL

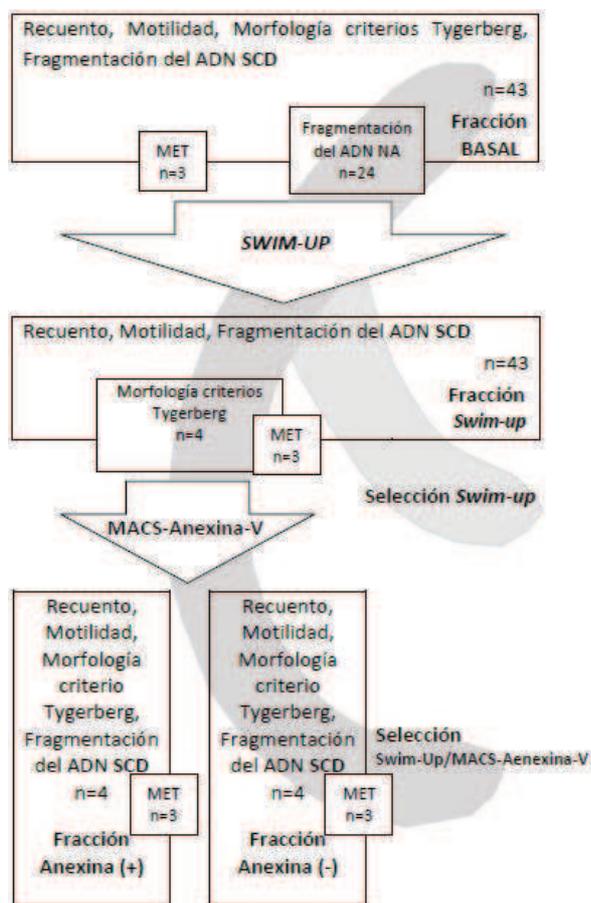
Analizar el uso de diversas técnicas de detección de daño del ADN espermático en una población de hombres infértiles correlacionándolas con los parámetros del espermograma clásico, además de comprobar si la combinación de las técnicas de selección de espermatozoides *swim-up* y MACS-Anexina-V puede mejorar la calidad de la muestra espermática.

La hipótesis testada fue que el daño del ADN espermático se correlaciona con los parámetros espermáticos indicadores de infertilidad masculina y que la técnica *swim-up*/MACS-Anexina-V es capaz de mejorar la calidad del semen mediante la eliminación de espermatozoides dañados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analizar y comparar dos métodos de detección de daño en el ADN espermático (SCD y NA), en pacientes infértiles.
- 2) Correlacionar los datos obtenidos respecto al daño del ADN espermático, con los parámetros evaluados en el espermograma convencional, antes y después de un método rutinario de selección (*swim-up*).
- 3) Determinar la eficiencia de la selección de espermatozoides por *swim-up*/MACS-Anexina-V cotejándola con la eficiencia de la selección por *swim-up* únicamente.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Para cumplir el objetivo 1 se analizaron muestras obtenidas de 50 pacientes infértiles por dos métodos de detección de daño espermático y se observó la correlación entre ambos con la morfología y la motilidad.

Para cumplir el objetivo 2 se correlacionaron estadísticamente la edad del paciente, la morfología y la motilidad espermática con el índice de fragmentación del ADN evaluado por SCD en la muestra fresca y en la fracción seleccionada por *swim-up*.

Para cumplir el objetivo 3 se analizaron las diferentes fracciones obtenidas luego de la separación con *swim-up*/MACS-Anexina-V de 3 o 4 muestras de pacientes seleccionados de acuerdo al resultado de espermogramas previos. Se compararon la muestra de partida, la fracción celular seleccionada y la fracción celular de descarte, mediante el análisis de la morfología por microscopía de campo claro y por microscopía electrónica de transmisión, el estudio de la motilidad espermática, y la evaluación del daño en el ADN de los espermatozoides testeado por SCD. (Figura 1)

Fig. 1 – Esquema del diseño experimental. Se detallan los pasos de las dos selecciones de espermatozoides realizadas, las fracciones obtenidas, los parámetros testeados en cada una de ellas y el n (número de muestras) estudiadas. SCD=*Sperm Chromatin Dispersion*; NA=Naranja de Acridina; MET=Microscopía Electrónica de Transmisión; MACS=*Magnetic-Activating Cell Sorting*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes.

Se trabajó con 50 pacientes con infertilidad conyugal, seleccionados del programa de fertilización *in vitro* (FIV) del Centro de Reproducción Humana del Interior (Cerhin). Todos fueron sometidos a un examen físico estándar para descartar volumen anormal de las glándulas reproductivas y/o presencia de varicocele. De ellos 7 fueron excluidos del estudio por presentar una concentración espermática basal insuficiente para realizar la técnica de *swim-up* y los demás ensayos ($<2 \times 10^6$ /mL). A las muestras de semen de los 43 pacientes restantes se les realizó el estudio de rutina basal y la separación por *swim-up*. La fragmentación del ADN de la fracción basal y de la obtenida por *swim-up* de todas las muestras se estudió por el test SCD. Además a 24 muestras elegidas al azar se les realizó el test de NA en la fracción basal. En la fracción seleccionada por *swim-up* de las 43 muestras se analizó la concentración y la motilidad espermática. Se escogieron 4 muestras con un recuento total superior a 200×10^6 espermatozoides

para testear el proceso de selección que combina *swim-up* y MACS-Anexina-V. En las fracciones obtenidas durante dicho proceso se analizó concentración, motilidad, morfología, fragmentación del ADN espermático (test SCD), y características ultraestructurales (MET). (Figura 1)

Obtención de las muestras y estudio basal.

Las muestras de semen se recolectaron por masturbación luego de una abstinencia sexual de 2 a 7 días en recipientes plásticos descartables estériles para análisis clínicos. Luego de la licuefacción se evaluó el pH y las características macroscópicas del semen (volumen, viscosidad, turbidez, color, presencia de coágulos gelatinosos). El análisis microscópico se realizó en cámara de Makler (Sefi-Medical Instruments, Haifa – Israel) con magnificación 200X y en microscopio de campo claro (Olympus CH) evaluándose por duplicado y en al menos 200 espermatozoides la motilidad³, su concentración en millones por mililitro, el recuento total en millones de células, y la presencia en la muestra de otros tipos celulares (Fracción Basal).

Evaluación de la morfología espermática.

La morfología espermática se evaluó según el criterio estricto de Tygerberg en microscopio de campo claro (Olympus CH) empleando una lente objetiva 100X, bajo aceite de inmersión (magnificación final 1000X). Para ello se realizaron extendidos en portaobjetos que luego de fijarlos en metanol absoluto se tiñeron con hematoxilina de Harris. Para la evaluación de la morfología en la fracción basal, los extendidos se realizaron con 10 μ L de la muestra fresca luego de su licuefacción. Para la evaluación de la morfología en la fracción “*swim-up*”, los extendidos se realizaron con 10 μ L de la suspensión producto de la selección de espermatozoides por *swim-up* (ver más adelante). Se estudió un mínimo de 200 espermatozoides por preparado y se registró el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales.

Selección de espermatozoides por Swim-Up.

La técnica de *swim-up* empleada se conoce como *swim-up* convencional (Sánchez *et al.*, 2009; Franco Jr. *et al.*, 2000; Ahumada *et al.*, 1998). Brevemente, tras su licuefacción las muestras se lavaron dos veces en medio *Hepes-Modified Human Tubal Fluid with Gentamicin* (Irvine Scientific, Santa Ana CA, USA) suplementado al 10% con *Serum Substitute Supplement*, (mHTF-SSS, Irvine Scientific) para descartar el plasma seminal. Sobre cada pellet obtenido se colocaron 500 μ L de mHTF-SSS. Luego de incubar a 37°C durante 60 minutos se recolectaron los sobrenadantes ahora enriquecidos con espermatozoides móviles (Fracción *Swim-up*).

Selección de espermatozoides por MACS-Anexina-V.

La selección de espermatozoides por MACS-Anexina-V se realizó según las especificaciones del fabricante con mínimas modificaciones. Para ello las fracciones “*swim-up*” se lavaron con *Binding Buffer* 1X (Miltenyi Biotec, Germany) (BB), y se incubaron en una suspensión de microesferas submicroscópicas superparamagnéticas conjugadas con anexina V (Miltenyi Biotec) durante 25 minutos a temperatura ambiente bajo agitación continua moderada. Luego la suspensión se pasó a través de una columna (*MS Columns*, Miltenyi Biotec) sometida a un fuerte campo magnético (0,5 T entre los polos del magneto, más de 1,5 T entre las esferas metálicas de la columna). La fracción que se recolectó tras el pasaje a través de la columna se corresponde

³ Se trabajó con los valores de “motilidad progresiva”, siendo éstos las categorías “A+B” según OMS, 1999

con la fracción de espermatozoides anexina (-) mientras que la que quedó capturada en la columna fue la fracción anexina (+). Ambas se lavaron en mHTF-SSS. Los parámetros cinemáticos se evaluaron inmediatamente después de la recolección y tras una incubación de 30 minutos a 37° informándose esta última medición. Las determinaciones de morfología, fragmentación del ADN y MET se realizaron luego de la incubación. Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar horizontal.

Estudio de la fragmentación del ADN espermático.

Test de dispersión de la cromatina (*Sperm Chromatin Dispersion Test*)

El test se realizó según modificaciones introducidas por Fernández y colaboradores en 2005 (Fernández *et al.*, 2005), incluyendo las muestras en un microgel de agarosa de bajo punto de fusión (*Agarosa II Low Melting Point*, Amresco, USA) en un portaobjetos pretratado con una lámina de agarosa al 1% (*Agarosa A*, BioBasic, Canadá) y realizándoles un tratamiento de desnaturalización ácida (HCl) y uno de lisis (2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propanediol (Tris) 0.001-2M (Amresco); Triton X100 0.1-3% (Amresco); NaCl 1-3M (Amresco); dithiothreitol (DTT) 0.001-2M (Amresco)) para su posterior tinción con solución de Wright y su observación en microscopio de campo claro (Olympus CH) bajo un aumento de 400X. Se evaluaron 200 espermatozoides por duplicado y se registró el promedio de los porcentajes de espermatozoides con ADN fragmentado.

Test de Naranja de Acridina (NA).

Este test se realizó en extendidos de espermatozoides sobre portaobjetos fijados *overnight* con metanol y ácido acético en proporciones 3:1 y teñidos con solución de Naranja de Acridina (0,19 mg/mL) al reparo de la luz. Las preparaciones se observaron en microscopio de epifluorescencia (Nikon) a 400 aumentos con una longitud de onda de excitación de 450-490 nm. Tras evaluar 200 espermatozoides por lámina se registró el porcentaje de espermatozoides con daño en su ADN.

Análisis de las muestras mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).

Para el estudio de las características ultraestructurales de los espermatozoides por MET, una alícuota de 0,5-1,0 mL de cada fracción espermática se centrifugó durante 5 minutos a 6000 rpm. Los pellets obtenidos fueron resuspendidos y fijados durante toda la noche en una solución de paraformaldehído (PAF) al 4% (v/v) en buffer fosfato (PB) con 2,5% (v/v) de glutaraldehído, pH 7.2-7.4. La post-fijación se realizó en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias (UDELAR) exponiendo los pellets a una solución de tetróxido de osmio al 1% (v/v) durante una hora. Luego de sucesivos lavados en PB, el material se deshidrató mediante pasajes por soluciones de etanol de concentración creciente seguidos de acetona ppa al 100% (v/v). Acto seguido las muestras fueron embebidas en araldita (Fluka) de concentración creciente, e incluidas en bloques de araldita pura que se polimerizaron en estufa a 60°C durante 48hs. Se realizaron cortes semi y ultrafinos (250-500nm y 50-70 nm respectivamente) de las preparaciones con un ultramicrotomo RMC MT-X (RMC Products, Arizona, USA) con una cuchilla de diamante *Diatome*. Los cortes fueron contrastados con una solución acuosa de acetato de uranilo a saturación, seguido de citrato de plomo (Reynolds) y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1010 (Jeol, USA) a 80 kV. Las imágenes fueron capturadas mediante una cámara digital Hamamatsu C-4742-95 (Hamamatsu Photonics UK Limited, United Kingdom) y procesadas en el programa Photoimpact 4.2. Por cada fracción

se analizaron al menos 100 secciones de cabezas y 100 correspondientes a colas espermáticas. Las características ultraestructurales se clasificaron según Chemes y Rawe (2003) (ver figura 12) y se expresaron como media \pm desvío estándar (media \pm SD) del porcentaje del total de secciones observadas de cada preparación.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo utilizando el software JMP 8.0 Statistical Discovery Software (SAS Institute Inc.) y el SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc.). Para las diferencias entre medias se utilizó t-test y ANOVA, y en la búsqueda de asociaciones se utilizaron análisis bivariados o multivariados aplicando el test de correlación de Pearson. Valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

-1-

Análisis comparativo de dos métodos de detección de daño en el ADN espermático (SCD y NA) en pacientes infértiles.

Comparación de los resultados del test SCD y del test NA con su correlación con parámetros del espermograma convencional (morfología y motilidad).

Se comparó el resultado de los estudios de asociación de la morfología según criterios de Tygerberg y la motilidad progresiva, con la fragmentación del ADN espermático cuando ésta se mide por NA o SCD, en las 24 muestras evaluadas con ambas técnicas.

Se encontró que los resultados del test SCD se correlacionan significativamente de manera inversa con la motilidad progresiva ($r = -0,656$, $P < 0,0005$; Figura 2A, ver también figura 6), y que tienden a asociarse también inversamente con la morfología según Tygerberg. ($r = -0,266$, $P > 0,05$; Figura 2C, ver también figura 4). No se hallaron asociaciones significativas ni tendencias cuando se analizó la correlación de los mismos parámetros con los resultados del test de NA. (Figuras 2B y 2D)

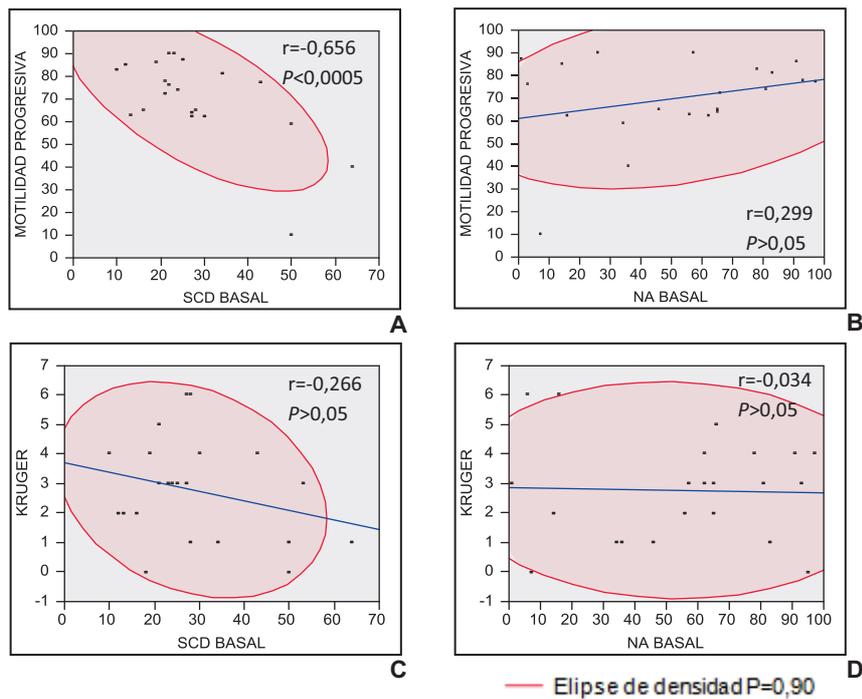


Fig. 2 – Comparación de los resultados de los test de evaluación de daño en el ADN con su correlación con motilidad y morfología. Diagramas de dispersión de los análisis de correlación de la fragmentación del ADN espermático evaluada por SCD con la motilidad progresiva (A) y la morfología según Tygerberg (KRUGER) (C); y de la fragmentación evaluada por NA con la motilidad progresiva (B) y la morfología según Tygerberg (KRUGER) (D). En los casos en que la correlación no es estadísticamente significativa se muestra la línea de tendencia en azul. n=24 (r, coeficiente de correlación de Pearson; NA, naranja de acridina)

Correlación entre los resultados del test SCD y del test de NA para la determinación de la fragmentación del ADN espermático.

Cuando se compararon las determinaciones de los índices de fragmentación del ADN por NA con los resultados del test SCD realizado sobre las mismas muestras frescas no se encontró correlación significativa alguna entre ambas pruebas ($r = -0,143$; $P > 0,05$). (Figura 3A)

Debido a que no se observó correlación entre SCD y NA y a que el primer test concuerda mejor con los parámetros del espermograma clásicamente relacionados con la capacidad fecundante del espermatozoide, en este trabajo la fragmentación del ADN espermático se continuó evaluando mediante el test SCD.

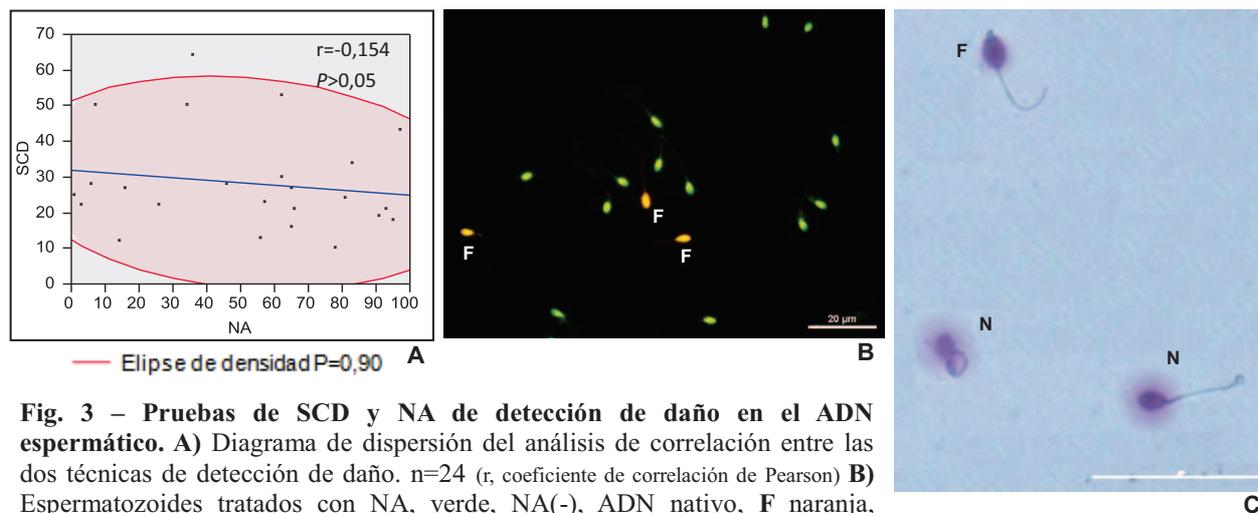


Fig. 3 – Pruebas de SCD y NA de detección de daño en el ADN espermático. A) Diagrama de dispersión del análisis de correlación entre las dos técnicas de detección de daño. $n=24$ (r , coeficiente de correlación de Pearson) **B)** Espermatozoides tratados con NA, verde, NA(-), ADN nativo, **F** naranja, NA(+), ADN fragmentado. **C)** Espermatozoides tratados con SCD, **F** sin halo de dispersión de la cromatina, ADN fragmentado; **N** halo de dispersión presente, ADN nativo.

-2-

Correlación entre daño del ADN espermático con los parámetros evaluados en el espermograma convencional, antes y después de un método rutinario de selección (*swim-up*).

Relación entre la fragmentación del ADN espermático y la edad del paciente.

El promedio de edad de los pacientes incluidos en el estudio fue igual a $36,45 \pm 5,79$ años, con un rango comprendido entre los 25 y los 50 años. Debido a que se ha reportado una relación entre daño espermático y edad de los pacientes infértiles (Vagnini *et al.*, 2007), se estudió la relación entre estas dos variables discriminando entre el nivel de fragmentación del ADN espermático de la fracción basal, la fracción post-*swim-up* y la variación entre ambos. (Figura 3) Se encontró una asociación significativa entre la edad y el índice de fragmentación de la fracción espermática seleccionada por *swim-up* ($P < 0,05$). Dicha asociación es directa ($r = 0,361$). (Figura 3B)

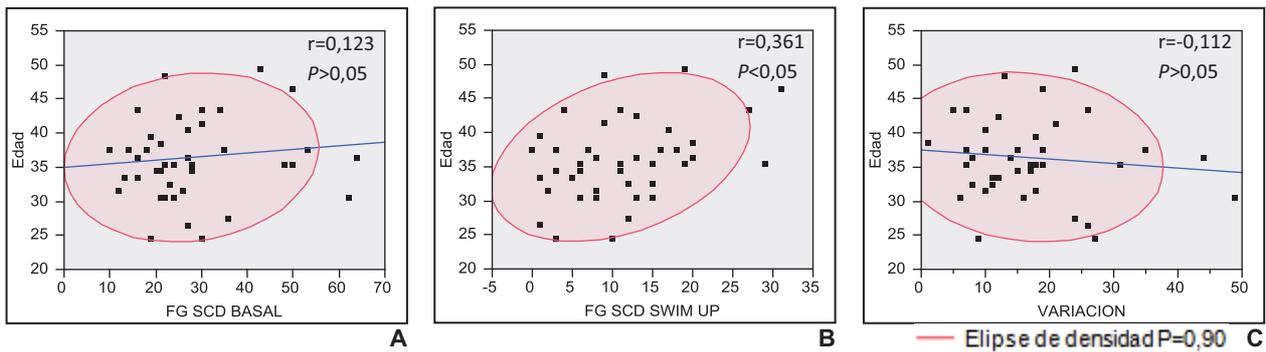


Fig. 3 – Relación entre la edad y la fragmentación del ADN espermático (SCD). Los diagramas de dispersión presentan los resultados del análisis bivariado de la edad vs. el índice de fragmentación del ADN espermático medido por test SCD de la fracción basal (A), el de la seleccionada por *swim-up* (B) y la diferencia entre ambos (C). En cada uno se muestra la correlación existente entre las variables evaluadas. En A y C puede verse la línea de tendencia. n=43 (r, coeficiente de correlación de Pearson)

Relación entre la morfología espermática según criterios estrictos y la fragmentación del ADN.

Del análisis bivariado de la morfología espermática según criterios de Tygerberg y el porcentaje de espermatozoides con ADN dañado se observó una tendencia de correlación (no significativa estadísticamente) entre la morfología y la fragmentación del ADN de la fracción basal, que se acentuó cuando la morfología basal se correlacionó con la fragmentación del ADN de la fracción seleccionada por *swim-up*. No se evidenció ninguna correlación cuando se estudió la morfología con la diferencia entre los índices de fragmentación del ADN de las fracciones mencionadas. (Figura 4)

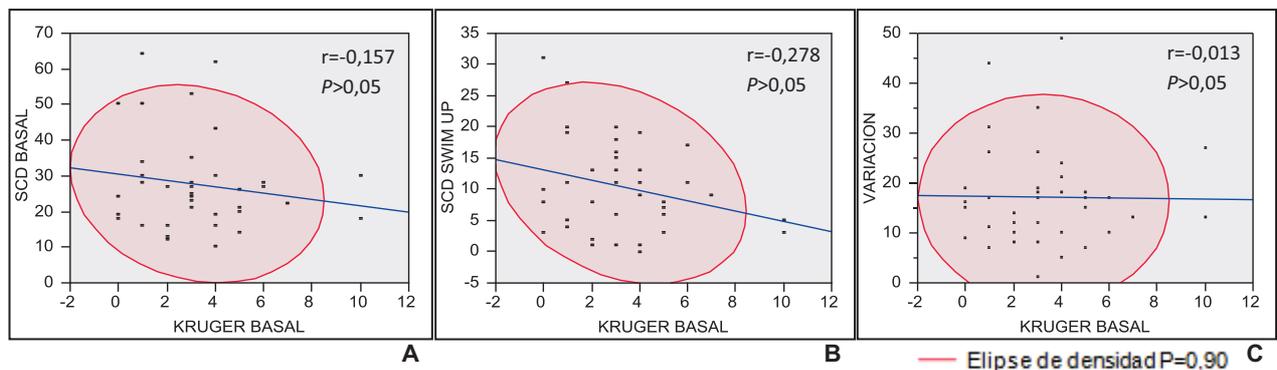


Fig. 4 – Relación entre la morfología espermática y la fragmentación del ADN espermático (SCD). Los diagramas de dispersión presentan los resultados del análisis bivariado de la morfología según criterios de Tygerberg (KRUGER) vs. el índice de fragmentación del ADN espermático medido por test SCD de la fracción basal (A), el de la seleccionada por *swim-up* (B) y la diferencia entre ambos (C). En cada uno se muestra la correlación existente entre las variables evaluadas y las líneas de tendencia. n=43 (r, coeficiente de correlación de Pearson)

Relación entre la motilidad progresiva y la fragmentación del ADN espermático.

Para determinar la relación entre la motilidad progresiva y la fragmentación del ADN se tomaron todos los pares de datos de las fracciones basales y todos los pares de datos de las suspensiones obtenidas tras la separación por *swim-up*. De esta forma se alcanzó un número de 75 pares de valores. Nótese que este número es menor al doble del número de muestras que se manejaron ya que a algunas muestras no se les analizó la motilidad post-*swim-up*.

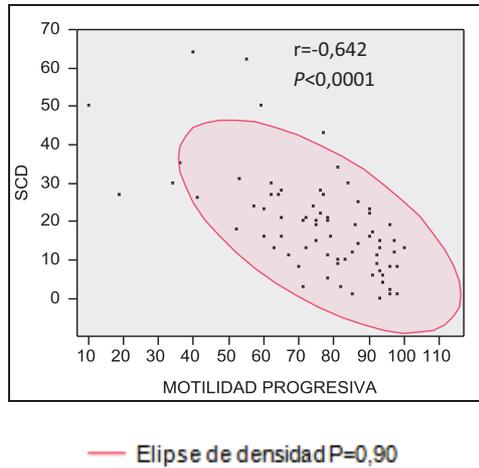


Fig. 5 – Relación entre la motilidad progresiva y la fragmentación del ADN espermático (SCD). Diagrama de dispersión que esquematiza el análisis de correlación entre la motilidad progresiva (categorías A+B según OMS, 1999) y el índice de fragmentación del ADN espermático medido por el test SCD. Los valores graficados en la figura corresponden a porcentajes. n=75 (r, coeficiente de correlación de Pearson)

Se encontró que la motilidad progresiva y la fragmentación del ADN de los espermatozoides se relacionan de manera inversa ($r = -0,642$), y que esta relación es estadísticamente significativa ($P < 0,0001$). (Figura 5)

Efecto de la selección de espermatozoides por Swim-Up sobre el índice de fragmentación del ADN.

El índice de fragmentación del ADN espermático evaluado mediante el test SCD de la fracción de espermatozoides seleccionada por *swim-up* fue significativamente menor que el índice de fragmentación hallado en la fracción basal ($P < 0,001$). La variación media entre los índices mencionados fue de aproximadamente 17 puntos porcentuales. (Tabla 1; Figura 6A)

Tabla 1 - Fragmentación del ADN espermático (SCD) de la fracción basal y la seleccionada por *swim-up*. Los valores representan el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado sobre el total evaluado. La última columna corresponde a la diferencia entre las dos primeras. Los datos se presentan como media±desvío estándar. * indica diferencia significativa entre los dos valores ($P < 0,001$) n=43

BASAL	SWIM-UP	VARIACIÓN
27,79±12,95*	11,00±7,53*	16,79±9,79

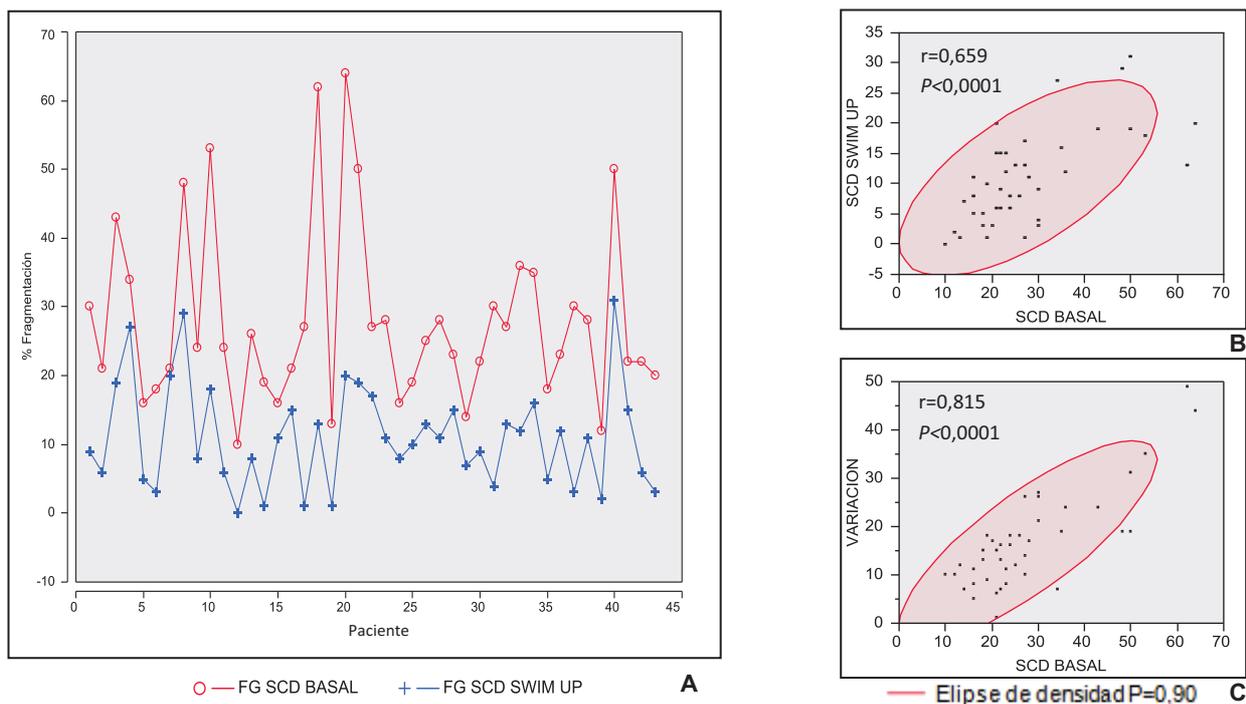


Fig. 6 – Fragmentación del ADN espermático evaluado por test SCD de las fracciones basal y post-swim-up.
A) En el gráfico se muestran apareados los valores del porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado de ambas fracciones. **B)** Diagrama de dispersión que esquematiza el resultado del análisis de asociación de ambas variables. **C)** Diagrama de dispersión que esquematiza el resultado del análisis de asociación de los índices de fragmentación del ADN espermático basal y la variación del índice de fragmentación basal y post-swim-up. $n=43$ (r , coeficiente de correlación de Pearson)

El estudio de la asociación entre estas variables mostró una correlación positiva entre los índices de fragmentación del ADN espermático basal y post-swim-up ($r=0,659$), siendo ésta correlación estadísticamente significativa ($P<0,0001$) (Figura 6B). El índice de fragmentación del ADN evaluado en la fracción basal se correlacionó positivamente con la variación observada entre los índices de fragmentación del ADN espermático basal y post-swim-up ($r=0,815$), siendo dicha correlación significativa ($P<0,0001$) (Figura 6C).

-3-

Determinación de la eficiencia de la selección de espermatozoides por swim-up/MACS-Anexina-V cotejándola con la eficiencia de la selección por swim-up únicamente.

Efecto de la selección de espermatozoides por swim-up/MACS-Anexina-V en la fragmentación del ADN espermático, en la cinemática y en la morfología según criterios estrictos.

Los resultados de los parámetros cinemáticos, la morfología según criterio de Tygerberg, y la fragmentación del ADN espermático evaluada por el test SCD, analizados durante el proceso de separación por swim-up/ MACS-Anexina-V se presentan en la tabla 2. Los dos últimos parámetros estudiados en cada fase del proceso de selección espermática se muestran graficados en la figura 7.

El examen cinemático mostró una mejora significativa ($P<0,001$) de la movilidad progresiva en la primera fase de la selección, esto es, debida a la separación de espermatozoides por la técnica de *swim-up*, prevista ya por los resultados antes expuestos. La comparación de este mismo parámetro antes y después del pasaje de los espermatozoides a través de la columna no reflejó significancia estadística. La movilidad de los espermatozoides que quedaron atrapados en la columna durante la separación, luego de ser eluidos resultó ser significativamente menor que la movilidad de las demás fracciones.

El índice de fragmentación del ADN espermático mostró también una mejora significativa ($P<0,05$) en la primera etapa de la selección, lo que concuerda con los resultados antes mencionados en el apartado “Efecto de la selección de espermatozoides por Swim-Up sobre el índice de fragmentación del ADN” de esta sección. El índice de fragmentación del ADN de los espermatozoides seleccionados por MACS-Anexina-V fue significativamente menor ($P<0,05$) que el índice de fragmentación detectado en la muestra basal, pero no se encontró diferencia estadísticamente significativa cuando se comparó con la muestra seleccionada por *swim-up*, que fue la suspensión de células que ingresó a la columna⁴. La diferencia entre el índice de fragmentación del ADN de los espermatozoides retenidos en la columna durante la separación y el de aquellos que fluyeron a través de la misma fue significativa ($P<0,05$).

La morfología espermática evaluada según criterios estrictos de Tygerberg no mostró cambios significativos durante el proceso de selección. Solamente se encontró una diferencia estadísticamente relevante entre las fracciones espermáticas separadas por las columnas, las fracciones ANEXINA (-) y ANEXINA (+) ($P<0,05$).

Tabla 2 – Efecto de la selección de espermatozoides por *swim-up*/MACS-Anexina-V. Cada columna representa una de las instancias de la separación: la muestra de partida (BASAL), la primera selección (*SWIM-UP*) y los productos finales de la separación (ANEXINA (-) y ANEXINA (+)). La morfología espermática se evaluó según criterios estrictos de Tygerberg, la fragmentación del ADN espermático por el test SCD y la movilidad progresiva según lineamientos de la OMS (1999). Todos los valores representan medias±SD. Aquellos que llevan un mismo subíndice difieren significativamente entre sí (con $P<0,001$ para motilidad, $P<0,05$ para fragmentación del ADN y morfología). n=4

	BASAL	SWIM-UP	ANEXINA (-)	ANEXINA (+)
MOVILIDAD PROGRESIVA % espermatozoides móviles progresivos (A+B)	74,75±7,54 ^{c,d}	90,25±5,56 ^{a,d}	85,50±7,33 ^b	10,75±9,36 ^{a,b,c}
FRAGMENTACIÓN DEL ADN % espermatozoides con ADN dañado	21,50±6,61 ^{1,2}	5,75±2,75 ¹	2,50±2,65 ^{2,3}	51,50±30,12 ³
MORFOLOGÍA % espermatozoides normales	4,50±2,52	5,25±2,75	7,00±1,41 [*]	0,75±0,96 [*]

⁴ Ver “Separación de espermatozoides por MACS-Anexina-V” en la sección “Materiales y Métodos”

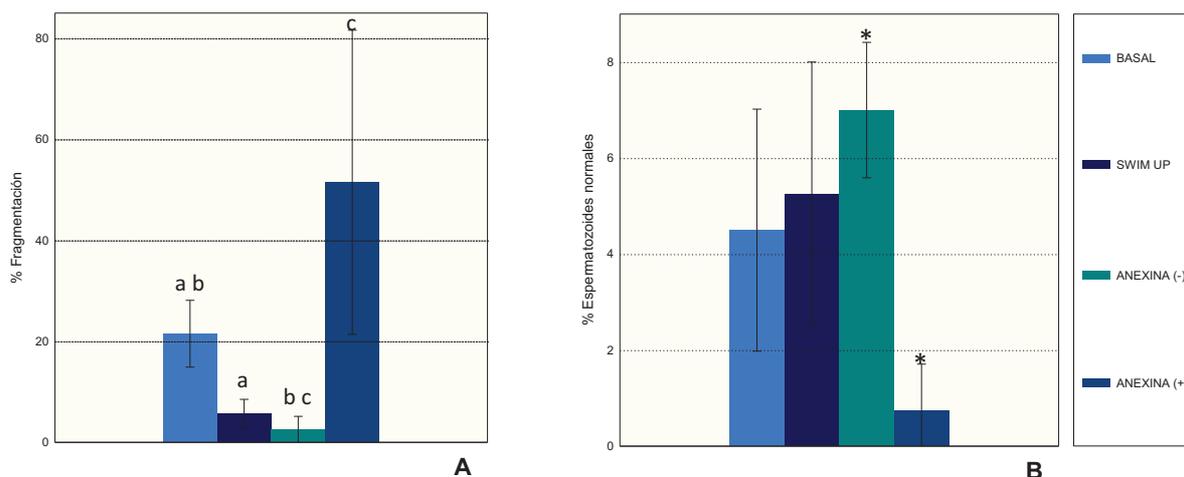


Fig. 7 – Efecto de la selección de espermatozoides por *swim-up*/MACS-Anexina-V en la morfología y la fragmentación del ADN espermático. **A)** Índices de fragmentación del ADN espermático evaluados por test SCD de las distintas fracciones del proceso de selección de espermatozoides por *swim-up*/ MACS-Anexina-V. El gráfico presenta la media con los desvíos estándar de los porcentajes de espermatozoides con daño en su ADN de todas las fracciones. Las barras con un mismo subíndice difieren significativamente entre sí ($P < 0,05$). **B)** Morfología espermática según criterios estrictos de Tygerberg de las fracciones del proceso de selección. El gráfico presenta la media con los desvíos estándar de los porcentajes de espermatozoides normales de todas las fracciones. * indica diferencia significativa entre las barras ($P < 0,001$). $n=4$

Efecto de la selección espermática por swim-up/MACS-Anexina-V en las características ultraestructurales de los espermatozoides.

Las características ultraestructurales de los espermatozoides a lo largo del proceso de selección fueron estudiadas por MET como se detalló en la sección “MATERIALES Y MÉTODOS”. En primera instancia se catalogaron las cabezas y colas como normales o anormales y se expresaron como porcentaje del total. Se consideró normal una cabeza espermática cuando su cromatina se presentaba compacta y uniforme, sin rarefacciones intranucleares que ocupasen más del 20% del núcleo, con membranas continuas y de aspecto uniforme, con un acrosoma de espesor constante, contenido uniforme, adherido al núcleo y recubriéndolo en un 40% - 70%, sin restos citoplasmáticos o membranosos y con forma global típica (Figura 12.1). Un corte de cola normal se contabilizó cuando presentaba el arreglo microtubular típico (9 pares periféricos más un par central) en el centro del flagelo, rodeado por membranas uniformes (Figura 12.2) y, dependiendo de la sección, una vaina de mitocondrias también uniforme (Figura 12.13). Toda cabeza o cola con alguna desviación en alguna de estas características fue considerada anormal.

Luego se discriminó en cuanto a las características ultraestructurales afectadas en las cabezas y colas. Se consideraron líticas aquellas cabezas con interrupciones en sus membranas, contenido nuclear diseminado y/o con signos de degradación (Figura 12.3); binucleadas cuando pudo observarse una clara división en el núcleo (Figura 12.4) y con restos de membrana o citoplasma cuando a pesar de observarse normales para los demás parámetros, presentaban restos membranosos o citoplasmáticos de un tamaño mayor al 20% del tamaño de la cabeza (Figura 12.5). La cromatina se clasificó como madura cuando se presentaba compacta y uniforme

(Figura 12.6); inmadura cuando se presentaba granular (Figura 12.7); o con presencia de rarefacciones intranucleares cuando éstas ocupaban más del 20% del núcleo (Figura 12.8). Los acrosomas se consideraron de forma alterada cuando su morfología se desviaba de la normal (Figura 12.9); desplazados o “festoneados” cuando no se encontraban adheridos al núcleo y se veían como en la figura 12.10; miniacrosomas cuando no alcanzaban a cubrir el 40% del núcleo (Figura 12.11); reaccionados cuando se observaban segmentados, en forma de “vacuolas” y/o con su contenido disperso (Figura 12.12). Dentro de las anomalías de cola se distinguió entre colas con elementos microtubulares supernumerarios cuando además de los pares canónicos presentaban uno o más pares de microtúbulos (indicado con flecha en la figura 12.13); con pares ausentes, en especial con ausencia del par central o configuración microtubular “9+0” (Figura 12.14); con desorganización total del axonema cuando los pares de microtúbulos se mostraban rompiendo la configuración canónica (Figura 12.15); con el axonema desplazado del centro del flagelo; y colas con hemiaxonema cuando se observaban como se indica en la figura 12.16.

En la tabla 3 se muestran los resultados de dicho estudio. Su representación gráfica puede verse en la figura 8. El análisis estadístico de la morfología de las cabezas espermáticas mostró que aumentaba el porcentaje de cabezas normales junto con el avance del proceso selectivo ($P < 0,05$). Los porcentajes de cabezas normales y de colas normales en la suspensión de espermatozoides retenida en la columna de separación resultaron significativamente menores que los hallados en la fracción celular seleccionada ($P < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas a lo largo de la selección para las demás características estudiadas.

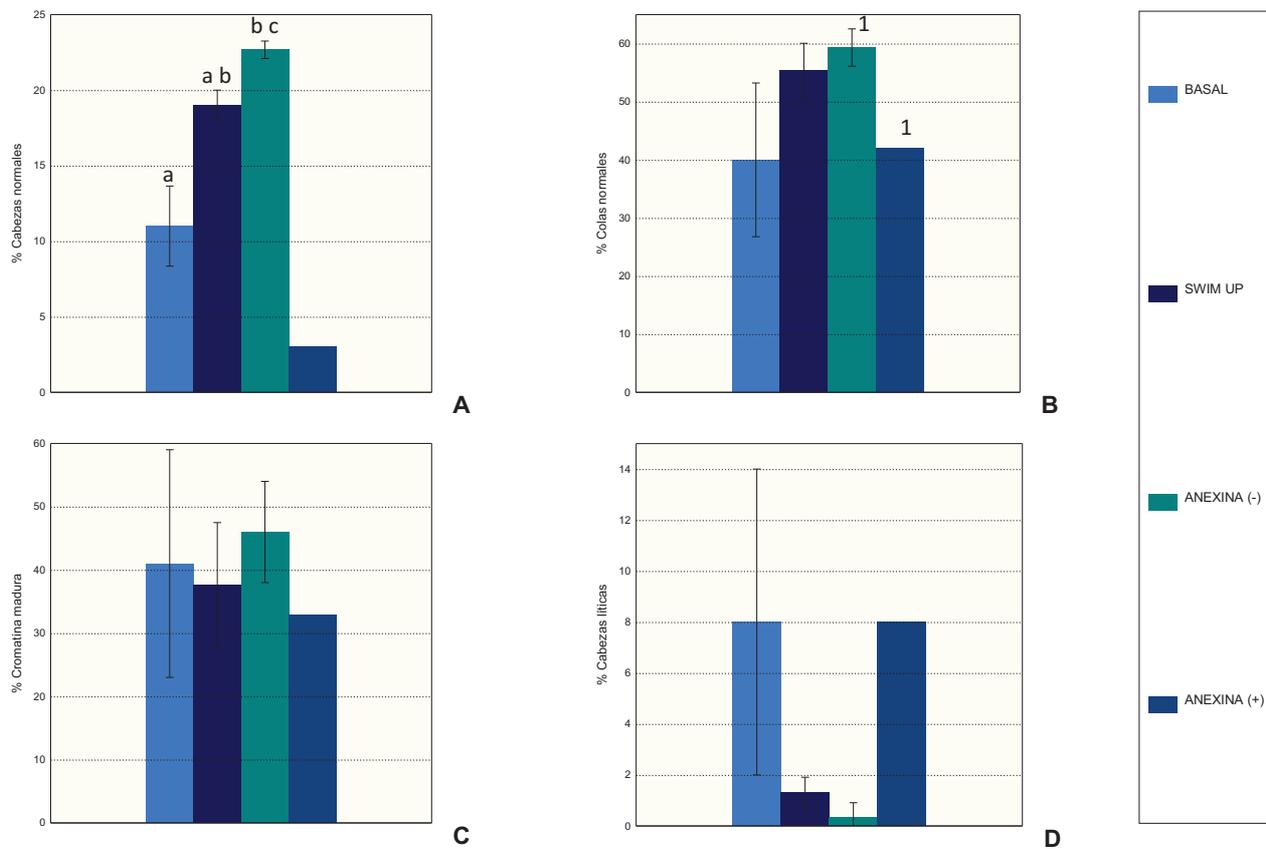


Fig. 8 – Swim-up/MACS-Anexina-V y ultraestructura. Histogramas del porcentaje de espermatozoides con la característica ultraestructural estudiada por MET según la etapa de la selección por swim-up/MACS-Anexina-V. **A)** Cabezas normales; **B)** Colas normales; **C)** Cromatina madura; **D)** Cabezas líticas. Las barras de error corresponden al desvío estándar. Las barras con subíndices iguales difieren significativamente entre sí ($P < 0,05$).

Tabla 3 – Resultados del estudio ultraestructural de los espermatozoides por MET durante la selección espermática usando swim-up/MACS-Anexina-V. Las columnas representan las etapas del proceso de selección mientras que en las filas se detallan las características ultraestructurales estudiadas. Los resultados se presentan como media de porcentajes±desvío estándar salvo en la columna “ANEXINA (+)” donde los desvíos estándar son cero. Los valores con subíndices iguales difieren significativamente entre sí ($P<0,05$).

		BASAL	SWIM UP	ANEXINA (-)	ANEXINA (+)
CABEZA	NORMAL	11,00 ± 2,65 ^a	19,00 ± 1,00 ^{ab}	22,67 ± 0,58 ^{abc}	3 ^c
	ANORMAL	89,33 ± 2,89	81,00 ± 1,00	75,67 ± 3,21	97
	LÍTICA	8,00 ± 6,00	1,33 ± 0,58	0,33 ± 0,58	8
	BINUCLEADA	1,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,58	0
	RESTOS CIT.	17,00 ± 5,29	19,00 ± 5,29	14,67 ± 5,77	7
CROMATINA	COMPACTA MADURA	41,00 ± 18,00	37,67 ± 9,81	46,00 ± 8,00	33
	GRANULAR INMADURA	39,67 ± 3,06	42,33 ± 8,62	38,67 ± 10,69	31
	VACUOLAS/RAREF.NUCL.	25,00 ± 8,89	23,67 ± 11,24	23,00 ± 7,00	29
ACROSOMA	NORMAL	43,00 ± 14,00	63,00 ± 13,89	59,67 ± 10,21	21
	ANORMAL	56,67 ± 13,32	36,00 ± 13,89	40,67 ± 9,87	79
	FORMA ALTERADA	20,00 ± 9,85	11,67 ± 5,86	12,00 ± 1,00	6
	DESPL/FESTONEADO	9,67 ± 4,62	10,00 ± 2,00	11,67 ± 2,52	4
	MINIACROSOMA	2,33 ± 0,58	1,67 ± 1,15	2,67 ± 0,58	1
	REACC/VACUOL/C.DISPER	19,33 ± 16,20	10,67 ± 6,81	12,33 ± 9,29	61
	AUSENTE	5,00 ± 7,00	2,00 ± 1,00	2,00 ± 1,00	7
COLA	NORMAL	40,00 ± 13,23	55,33 ± 4,73	59,33 ± 3,21 ^d	42 ^d
	ANORMAL	60,00 ± 13,23	44,67 ± 4,73	40,67 ± 3,21	58
	ELEM.SUPERNUMERARIOS	20,33 ± 5,03	20,67 ± 11,59	24,00 ± 6,24	11
	PARES AUSENTES	9,33 ± 4,51	6,00 ± 1,00	4,67 ± 4,73	11
	9+0	4,67 ± 2,08	2,33 ± 2,31	4,00 ± 2,65	9
	DESORG. TOTAL	14,33 ± 2,52	4,67 ± 3,06	3,33 ± 2,31	15
	DESPLAZ. AXONEMAL	2,00 ± 1,00	8,33 ± 5,51	1,67 ± 0,58	7
	HEMIAXONEMA	11,00 ± 3,61	2,00 ± 1,00	2,67 ± 2,89	6

Relación entre la morfología espermática según criterios de Tygerberg y las características ultraestructurales de la cabeza.

El estudio de correlación entre la morfología evaluada según criterios estrictos de Tygerberg y el porcentaje de cabezas normales según MET muestra que estos dos parámetros tienden a asociarse de manera positiva ($r=0,594$; $P=0,07$). (Figura 9) No se encontraron asociaciones entre la morfología según Tygerberg y las demás características de la cabeza estudiadas por MET (enumeradas en la tabla 3).

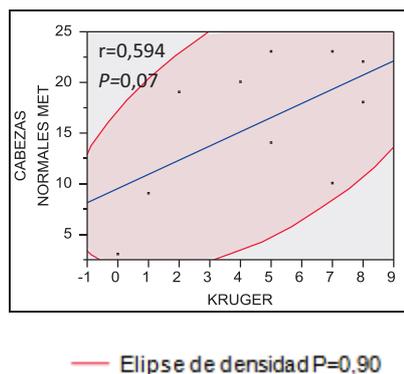


Fig. 9 – Relación entre la morfología según Tygerberg y el porcentaje de cabezas normales según MET. Diagrama de dispersión donde con el resultado de la correlación entre el porcentaje de espermatozoides normales según Tygerberg (KRUGER) y según MET. $n=10$ (r , coeficiente de correlación de Pearson)

Relación entre la fragmentación del ADN espermático y las características ultraestructurales.

Se analizaron las asociaciones entre el índice de fragmentación del ADN medido por el test SCD con las características ultraestructurales de los espermatozoides evaluadas por MET. Se halló que dicho índice y el porcentaje de cabezas ultraestructuralmente normales se correlacionan

negativamente y que ésta correlación es francamente evidente y estadísticamente significativa ($r = -0,916$; $P < 0,0003$). (Figura 10A) Con el porcentaje de espermatozoides líticos el índice de fragmentación del ADN se relaciona positivamente ($r = 0,835$; $P < 0,003$). (Figura 10B) Con el porcentaje de colas ultraestructuralmente normales, el índice de fragmentación del ADN de nuevo se asocia en forma negativa ($r = -0,873$; $P < 0,002$). (Figura 10C) Entre los demás parámetros ultraestructurales estudiados y el índice de fragmentación del ADN no se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa.

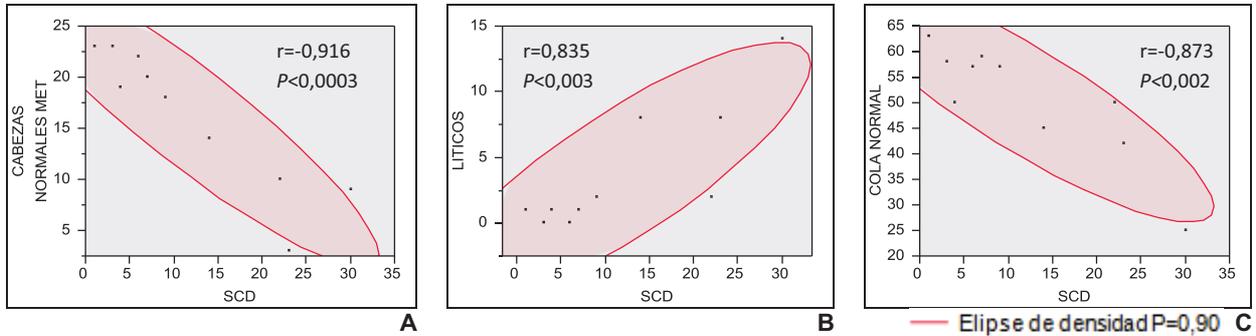


Fig. 10 – Relación entre la fragmentación del ADN y las características ultraestructurales. Diagramas de dispersión en donde se muestran los resultados de los análisis de asociación entre el índice de fragmentación del ADN espermático medido por el test SCD y el porcentaje de cabezas normales (A); el porcentaje de espermatozoides líticos (B); y el porcentaje de colas normales (C); los tres parámetros estudiados por MET. $n = 10$

(r , coeficiente de correlación de Pearson)

Relación entre la motilidad espermática progresiva y las características ultraestructurales de la cola.

Se estudiaron las características ultraestructurales de la cola evaluadas por MET y la motilidad progresiva de los espermatozoides en búsqueda de asociaciones entre ellas. Se encontró que la motilidad progresiva se correlaciona negativamente y de forma significativa con algunas anomalías ultraestructurales de la cola que refieren a la organización de las fibras del flagelo como la ausencia de algún par de microtúbulos ($r = -0,560$; $P < 0,02$; Figura 11A), la ausencia del par central (configuración 9+0) ($r = -0,632$; $P < 0,05$; Figura 11B) y la desorganización total del axonema ($r = -0,632$; $P < 0,05$; Figura 11C).

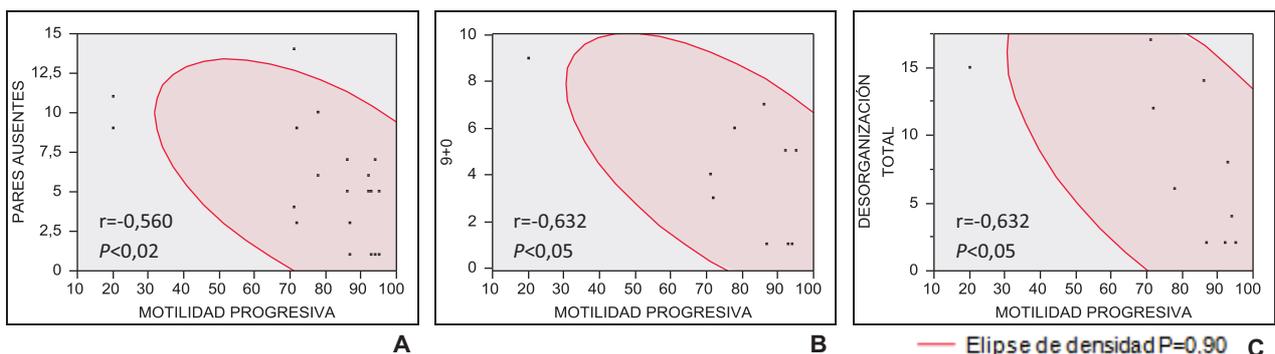


Fig. 11 – Relación entre anomalías ultraestructurales de la cola y la motilidad progresiva. Diagramas de dispersión que grafican los resultados del análisis de correlación de la motilidad progresiva con la ausencia de pares microtubulares en el flagelo (A); la ausencia del par central (B); y la desorganización total del axonema (C). En A, $n = 20$; en B y C $n = 10$.

(r , coeficiente de correlación de Pearson)

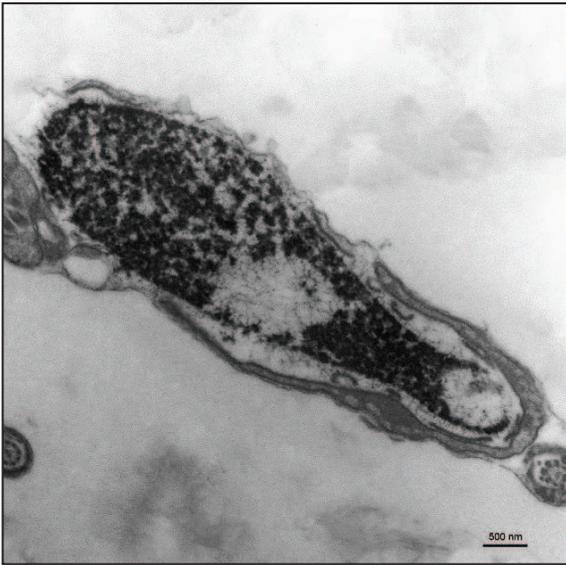
En los últimos 3 apartados el “ n ” de los estudios de asociación es 10 ya que se realizaron incluyendo todas las muestras con análisis ultraestructural sin importar la fracción del proceso de selección.



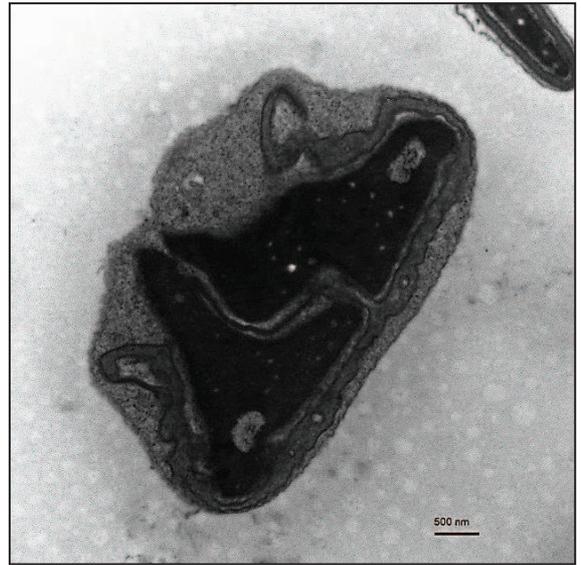
12.1



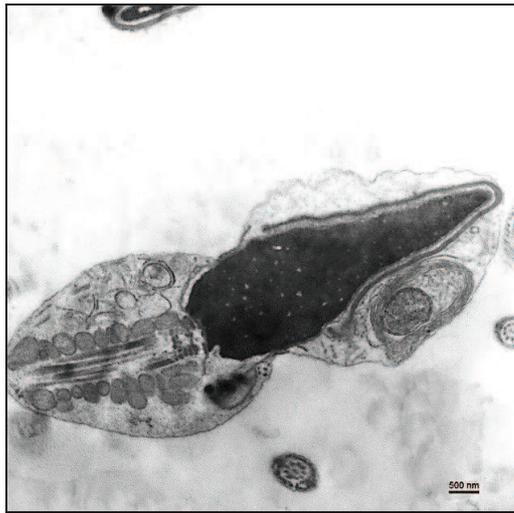
12.2



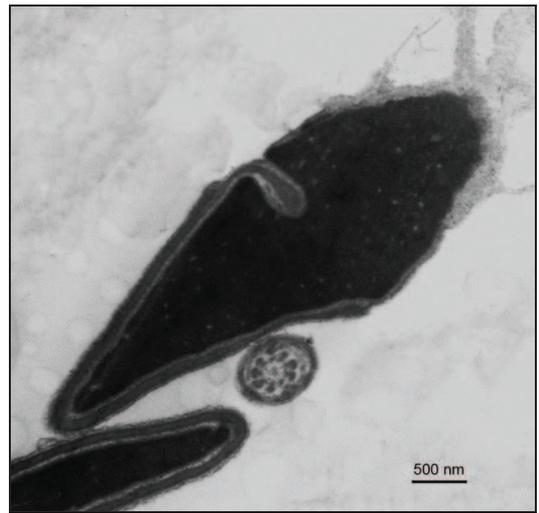
12.3



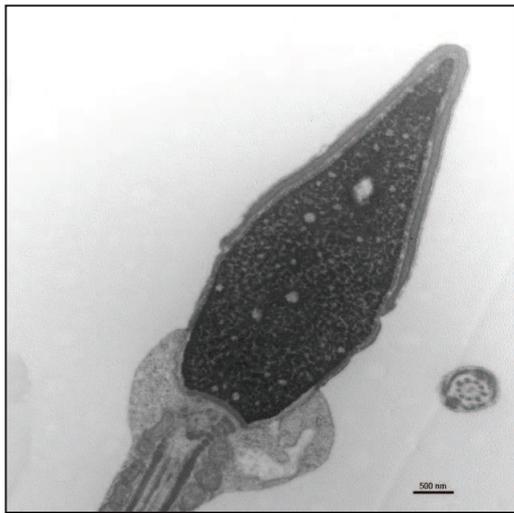
12.4



12.5



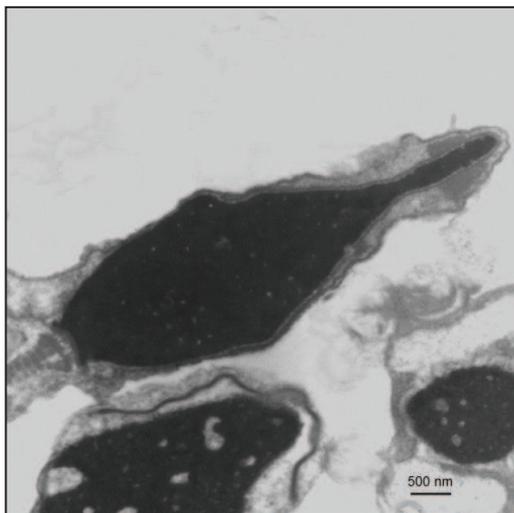
12.6



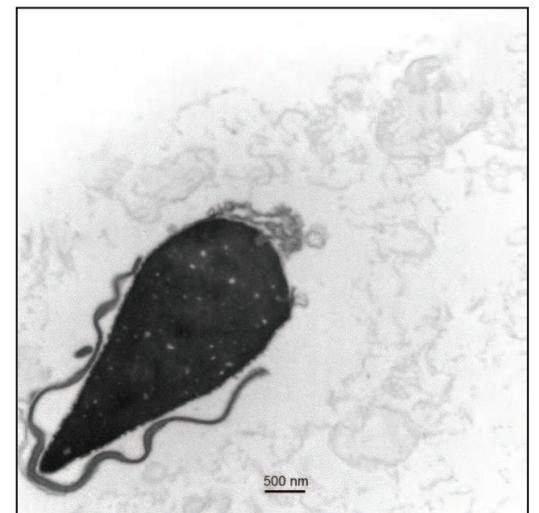
12.7



12.8



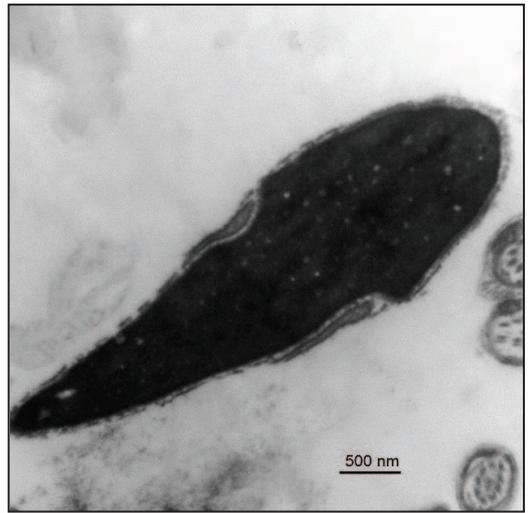
12.9



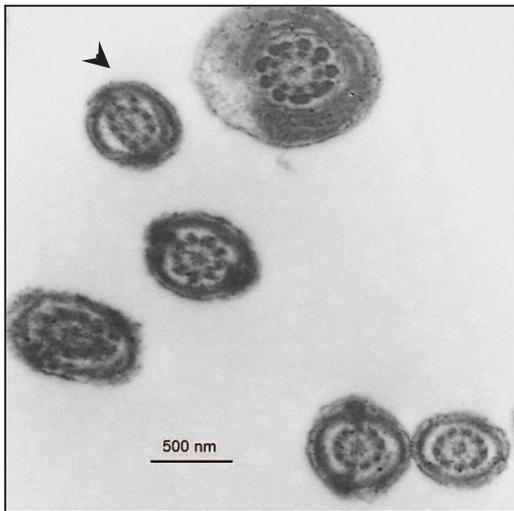
12.10



12.11



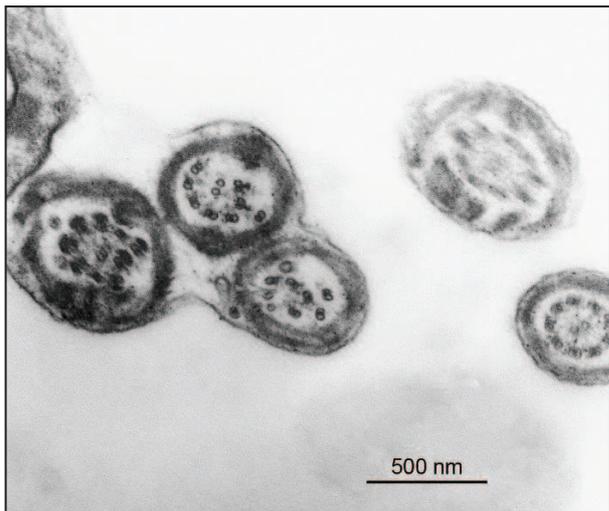
12.12



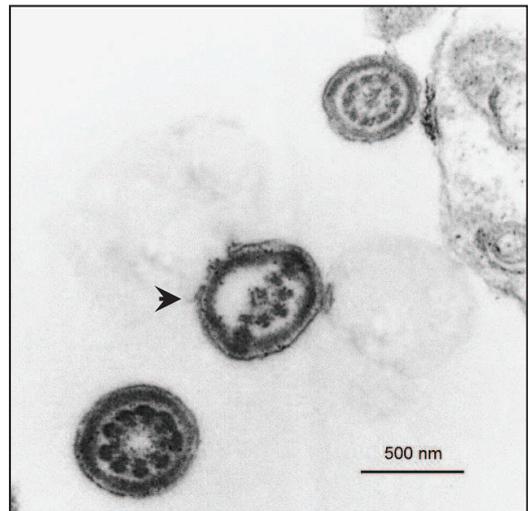
12.13



12.14



12.15



12.16

Figura 12 – Micrografías electrónicas.

12.1 – Cabeza normal

12.2 – Cola normal

12.3 – Cabeza lítica

12.4 – Cabeza binucleada

12.5 – Espermatozoide con restos citoplasmáticos y de membranas

12.6 - Cromatina compacta madura. A pesar de la madurez de la cromatina este espermatozoide es anormal (nótese la invaginación del acrosoma)

12.7 – Cromatina granular inmadura. Pese a su morfología correcta, este espermatozoide se califica como anormal por la inmadurez de su cromatina.

12.8 – Espermatozoide con rarefacciones nucleares (vacuolas intranucleares)

12.9 – Acrosoma con alteraciones de forma

12.10 – Acrosoma desplazado/festoneado. El acrosoma claramente se ve desplazado de su posición normal.

12.11 – Miniacrosoma. Las puntas de flecha indican los límites del acrosoma que cubre menos del 40% de la cabeza.

12.12 – Acrosoma reaccionado. La punta de flecha indica restos/vacuolas acrosómicos.

12.13 – Cola con elementos supernumerarios. La cola con el par supernumerario está señalada con la punta de flecha.

12.14 – Cola con configuración microtubular 9+0. La punta de flecha señala un par supernumerario presente en este flagelo.

12.15 – Desorganización total de la cola. A la izquierda de esta micrografía se ven tres flagelos cuya configuración microtubular es de desorganización total. En la esquina inferior derecha puede verse una cola normal.

12.16 – Hemiaxonema. En el centro de la micrografía se ve un hemiaxonema señalado con la punta de flecha. También puede verse una cola normal (arriba) y un flagelo “9+0” (abajo).

DISCUSIÓN

La fragmentación del ADN espermático es un parámetro que se incluyó en el estudio seminal de rutina hace relativamente poco tiempo y no se cuenta con valores de corte claramente establecidos (Makhlouf y Niederberger, 2006). Tanto es así que la última edición del manual de la OMS poco dedica a este tema y no está incluida su determinación dentro de los ensayos de rutina recomendados (WHO, 2010). Quizás por falta de comprensión sobre el significado de este daño en los pacientes concretos, en la clínica andrológica se ha generado cierto escepticismo (especialmente en nuestro medio) respecto a la necesidad de analizar este tipo de alteraciones. A pesar de ello, Aitken y De Iuliis (2010) recomiendan que el estudio del daño del ADN espermático en un paciente infértil debería ser considerado debido a que constituye un factor de riesgo que atenta contra el normal desarrollo de los embriones y posiblemente también de su progenie.

Dependiendo del tipo de daño, de cuándo éste es producido durante el desarrollo espermático, o de la región del genoma afectada, el embrión puede repararlo antes de su primera división mitótica con relativa eficiencia. Así, las probabilidades de que en la generación F1 aparezca un fenotipo producto del daño en el ADN introducido por el espermatozoide no son altas (se estima 1 en 100.000), pero el hecho de que nazcan niños normales tras TRA con espermatozoides con ADN dañado no significa necesariamente que sean genética o epigenéticamente normales o que

el daño no genere cambios fenotípicos en generaciones futuras. (Revisado en Aitken y De Iuliis, 2010).

Las técnicas desarrolladas para la evaluación de la fragmentación del ADN en espermatozoides difieren en el modo en que evidencian el daño cromatínico, en el equipamiento que requieren y en la interpretación del resultado que proveen (Gosálvez *et al.*, 2006). En este trabajo se eligieron dos por su bajo costo y su procedimiento rápido y sencillo. Al intentar relacionar los resultados de ambas técnicas aplicadas sobre las mismas muestras con la motilidad progresiva encontramos una correlación inversa con el test SCD y una tendencia directa con NA. Siendo la motilidad un parámetro evidente de calidad de una muestra espermática, tiene sentido que las muestras con más bajos porcentajes de espermatozoides móviles presenten mayor cantidad de espermatozoides con su ADN dañado. Además otros autores han reportado esto mismo evaluando la fragmentación del ADN espermático mediante la técnica de TUNEL (Ramos y Wetzels, 2001; Duran *et al.*, 2002; Mahfouz *et al.*, 2010) Teniendo en cuenta la morfología, no encontramos asociaciones estadísticamente significativas con ninguna de las dos metodologías de detección de daño empleadas.

No se encontró relación entre los resultados de ambos test aplicados sobre las mismas muestras. Tampoco se vio la disminución *post-swim-up* del índice de fragmentación observada por SCD cuando se determinó por NA (dato no mostrado), hecho que refuerza la idea de que ambas técnicas no se correlacionan.

Surge entonces la interrogante de cuál de los dos ensayos es más confiable. De acuerdo con la base de ambas técnicas, el test de NA evidencia fracturas en el ADN de un modo más directo que el test SCD, por lo que sería correcto pensar que los resultados del primero reflejan más la realidad de la integridad cromatínica que los del segundo. Como ya se vio, el test SCD marca roturas en el ADN de forma indirecta, basándose en la decondensación diferencial de la cromatina dañada con respecto a la cromatina intacta, mientras que el naranja de acridina es un intercalante que al asociarse con ADN monocatenario fluoresce en rojo y con ADN nativo se asocia como monómeros que fluorescen en verde. La visualización de los espermatozoides tratados con el test SCD no requiere de equipos con fluorescencia, y la discriminación entre los espermatozoides con y sin daño en su ADN es sencilla y muy evidente. (Figura 3C) No ocurre lo mismo con el test de NA, donde la fluorescencia pocas veces es verde o roja/anaranjada como se ve en la figura 3B. En su lugar, la señal se presenta en una gama de tonalidades entre los colores mencionados, dificultando enormemente la distinción de los espermatozoides cuyo ADN está sano de aquellos en los que no lo está, aumentando mucho la subjetividad del análisis. Por estas razones se eligió el test SCD para realizar el resto del trabajo. Esto no quiere decir que ambas técnicas no puedan ser complementarias una vez que se entiendan más los mecanismos que subyacen a la fragmentación del ADN espermático, ya que más allá de la subjetividad, los distintos resultados observados podrían ser explicados por las bases moleculares de naturaleza diferente de cada una de las técnicas.

Para su uso en TRA y muchas veces con fines diagnósticos, las muestras de semen deben ser procesadas para separar a los espermatozoides del plasma seminal o para seleccionar espermatozoides en base a algún parámetro. Cada laboratorio según su experiencia, teniendo en cuenta el uso que se le vaya a dar a la muestra de semen y sus características, tiene establecida la técnica de procesamiento a emplear con la misma. Para esta segunda parte se utilizó la técnica de *swim-up* convencional por ser la de uso de rutina de muchos laboratorios, incluido el del centro de donde se reclutaron los pacientes de este trabajo.

Los resultados indican que la preparación de semen mediante *swim-up* disminuye significativamente el índice de fragmentación del ADN espermático de la muestra seleccionada respecto de la muestra de partida. Esta mejora además es muy eficiente, ya que las muestras con índices de fragmentación más elevados presentan una disminución más notable que aquellas con índices de fragmentación basales más pequeños.

Además, encontramos que la influencia de la edad del paciente en la integridad del ADN de sus espermatozoides solamente se hace evidente cuando la fragmentación es evaluada luego del procesamiento de la muestra. Los análisis bivariados de la edad del paciente y los índices de fragmentación indican que el daño en el ADN de los espermatozoides tiende a aumentar conforme avanza la edad y esta tendencia es clara y significativa cuando la integridad de la cromatina se evalúa luego de la preparación del semen por *swim-up*. A su vez podría decirse que la disminución del porcentaje de espermatozoides con daño en su ADN producto de la selección espermática del *swim-up* tiende a ser menor a medida que la edad aumenta. La relación entre edad de los pacientes y daño del ADN espermático se debe tener en cuenta en el manejo del hombre infértil, especialmente cuando se utilizan TRA. Recientes descubrimientos señalan que el uso en TRA de muestras de semen de pacientes añosos que presentan daño en el ADN de los espermatozoides está asociado con la aparición en la descendencia de trastornos neurológicos poligénicos como epilepsia, esquizofrenia espontánea, autismo y enfermedad bipolar (Aitken y De Iuliis, 2010).

Cuando analizamos la morfología espermática de la fracción basal respecto de la fragmentación del ADN, observamos que muestras con bajos porcentajes de espermatozoides normales tienden a presentar índices de fragmentación del ADN elevados. Esta tendencia se acentúa cuando la fragmentación se evalúa luego de la selección de espermatozoides por *swim-up*. Pese a ello, ninguna de estas tendencias fue estadísticamente significativa. Estos resultados concuerdan con la idea de que la relación entre la fragmentación del ADN y la morfología espermática no es aún del todo clara (Winkle *et al.* 2009; Avendano y Oehninger, 2010).

En lo que tiene que ver con la motilidad, corroboramos la existencia de una fuerte relación entre esta y la fragmentación del ADN. Como se mencionó más arriba, la movilidad es el más claro signo de vitalidad del espermatozoide. Si bien individualmente no tiene por qué haber una relación entre movilidad y calidad de la célula, se acepta que muestras de semen que presentan alta motilidad espermática son de mejor calidad que muestras con baja motilidad (Bartoov *et al.*, 1991; Donnelly *et al.*, 1998). No extraña entonces que muestras con buenos porcentajes de espermatozoides móviles presenten bajos niveles de fragmentación del ADN espermático. Además vemos que el *swim-up*, separando espermatozoides en base a su movilidad, los selecciona también reduciendo el índice de fragmentación del ADN de la muestra de semen. Esto sugiere la existencia de alguna relación entre la integridad cromatínica y la cinemática de éstas células.

En las TRA y sobre todo en el ICSI la “selección natural” del espermatozoide que se da durante el proceso de fecundación *in vivo* debe ser sustituida por métodos de selección espermática *in vitro*. En ese sentido y buscando la optimización de esta “selección artificial”, testamos en este trabajo la aplicación de MACS-Anexina-V en combinación con la técnica de *swim-up*.

El análisis de la motilidad y la morfología espermáticas durante el proceso de selección realizado, permite observar que esta separación mejora ambos parámetros.

El incremento significativo en la motilidad está dado por el primer paso de la selección (el *swim-up*). Luego del pasaje a través de la columna los espermatozoides sufren una dramática disminución de su motilidad (datos no mostrados) posiblemente debido al estrés generado por la suma de varios factores a los que son sometidos durante dicho pasaje. Estos son el campo magnético del imán, la composición de naturaleza pobre del medio en el que están suspendidos los espermatozoides (*binding buffer*⁵) y la disminución de la temperatura que las células experimentan (la suspensión producto de la selección por *swim-up* se encuentra a 37°C, luego la incubación en *binding buffer* con las microesferas y el pasaje por la columna se realizan a temperatura ambiente⁴). Tras lavar el *binding buffer*, sustituirlo con mHTF-SSS, e incubar la suspensión a 37°C, al cabo de un tiempo los espermatozoides recuperan la movilidad, aunque no logran igualar la motilidad de la suspensión al ingresar en la columna. (Tabla 2) Pese a esto, la tendencia en el proceso completo es de un marcado aumento de éste parámetro.

El porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales según criterios estrictos tendió a aumentar durante el transcurso de la selección. Esta tendencia se hace más fuerte cuando los espermatozoides luego del *swim-up* son seleccionados por MACS-Anexina-V.

Se evaluó también el comportamiento del índice de fragmentación del ADN espermático durante el proceso de selección. A partir de los resultados de la segunda parte de este trabajo sabíamos que el *swim-up* por sí solo mejoraba significativamente este índice. En las muestras tratadas con el proceso de selección *swim-up*/MACS-Anexina-V observamos nuevamente esta mejora, que se acentuó (aunque no significativamente) tras el pasaje de la fracción seleccionada por *swim-up* a través de las columnas.

Al comparar estos tres parámetros (motilidad, morfología y fragmentación del ADN) en las fracciones ANEXINA (-) y ANEXINA (+) observamos que la motilidad y la morfología son notoriamente menores en la fracción ANEXINA (+), mientras que el índice de fragmentación del ADN de sus espermatozoides es francamente mayor. Se puede afirmar entonces que la técnica de MACS-Anexina-V separa de manera eficiente los espermatozoides teniendo en cuenta estas características.

La mejora significativa de la morfología de las cabezas a lo largo de la selección observada en el estudio ultraestructural de las fracciones, refuerza la validez de la marcada tendencia mencionada anteriormente de la morfología según criterios estrictos analizada por microscopía óptica. Pese a esto, según nuestros resultados, estas dos variables no se correlacionan significativamente (Figura 9). Cabe destacar que el porcentaje de cabezas ultraestructuralmente normales y la fragmentación del ADN se relacionan casi linealmente.

Por otro lado, el porcentaje de colas ultraestructuralmente normales tiende a aumentar durante el proceso selectivo, correspondiéndose con el aumento de la motilidad progresiva hallado. Según nuestros resultados ambas características están muy fuertemente asociadas, y para las dos se observa un salto importante entre la fracción basal y el producto de la selección por *swim-up*, lo que es coherente si se tiene en cuenta que la técnica de *swim-up* separa espermatozoides según su motilidad. Es esperable que los espermatozoides que presenten anomalías ultraestructurales en su flagelo presenten también trastornos cinemáticos, y por lo tanto no sean seleccionados por *swim-up*. De hecho encontramos que anomalías severas del flagelo como la ausencia de pares microtubulares, en especial del par central, y la desorganización total del axonema, se asocian negativamente con la motilidad progresiva. Además el porcentaje de colas ultraestructuralmente

⁵ Ver el apartado "Separación de espermatozoides por MACS" en la sección "MATERIALES Y MÉTODOS".

normales está significativamente disminuido cuando la muestra presenta índices de fragmentación del ADN espermático elevados, ya que observamos una relación fuertemente inversa entre ambas medidas. Reforzamos con este dato la idea de que existe una relación entre la cinemática del espermatozoide y la integridad de su ADN. Esta relación sería la responsable de la mejora en el índice de fragmentación observada luego del procesamiento por *swim-up*.

La mejora en el índice de fragmentación mencionada en el párrafo anterior tiende a acentuarse luego de la separación por MACS-Anexina-V, de modo que globalmente en el proceso de selección la fragmentación del ADN de una muestra de semen disminuye sensiblemente. Según nuestros resultados este proceso no influye sobre la madurez cromatínica observada por MET, aunque la presencia de rarefacciones nucleares, y el porcentaje de espermatozoides líticos, tenderían a disminuir durante la selección. (Tabla 3). Estos parámetros teóricamente podrían relacionarse con la fragmentación del ADN, y en este trabajo corroboramos la existencia de una correlación directa entre esta característica y el porcentaje de espermatozoides líticos. La fragmentación del ADN y la lisis celular son ambos eventos presentes en vías de muerte celular (Williams *et al.*, 1974; Cragg *et al.*, 2000), por lo que no sorprende la correlación hallada siendo que se espera que el proceso de selección utilizado deje atrás células necróticas o apoptóticas por el fundamento de la técnica de separación por MACS-Anexina-V. Nuestros datos sugieren que se debería ser cuidadoso antes de aplicar una técnica como MACS-Anexina-V en la clínica, teniendo en cuenta la alteración de la movilidad que sufren los espermatozoides tras el pasaje por el magneto y el hecho de que aproximadamente en el 10% de los espermatozoides seleccionados se observan por MET microesferas adheridas (dato no mostrado que difiere con lo planteado por otros autores (Rawe *et al.*, 2010; Paasch *et al.*, 2003)).

CONSIDERACIONES FINALES

En este trabajo se han estudiado pruebas que analizan la integridad del ADN espermático y métodos de selección de espermatozoides que o bien no se han implementado en la rutina de diagnóstico y tratamiento del hombre infértil, o se están implementando aún en fase de experimentación y con resultados a lo sumo controvertidos.

Si bien de aquí no se desprende si incluir una u otra técnica de detección de daño del ADN espermático actúa en beneficio del estudio del paciente infértil, ambas podrían dar información complementaria y creemos que estudios como éste son importantes con el fin de validar tecnologías en la práctica diagnóstica clínica sobre todo en nuestro medio para lograr consensos y establecer referencias locales.

Con respecto a las técnicas de separación espermática este trabajo deja ver que el *swim-up* convencional parece ser una excelente técnica de selección y que no serían necesarias metodologías sofisticadas y/o costosas para mejorar la calidad espermática. Pese a que la base teórica de la selección por MACS-Anexina-V es muy prometedora, existen consideraciones importantes antes de sugerir la aplicación de la misma en la práctica clínica. Creemos necesario el análisis de un mayor número de casos y el perfeccionamiento de la técnica introduciendo variantes con el objetivo de disminuir el porcentaje de microesferas adheridas a los espermatozoides seleccionados y minimizar el estrés que ocasiona la pérdida de la motilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken J.R. y De Iuliis G.N. 2007. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reproductive BioMedicine Online* (14) 727-733.
- Aitken J.R. y De Iuliis G.N. 2010. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* (16) 3-13.
- Aitken J.R., De Iuliis G.N., McLachlan R.I. 2008. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *International Journal of Andrology* (32) 46-56.
- Aitken R.J. 2006. Sperm function tests and fertility. *International Journal of Andrology* (29) 69-75.
- Aitken R.J. y Krausz C.G. 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* (122), 497-506.
- Aitken J.R., Koopman P., Lewis S.E. 2004. Seeds of concern. *Nature* (432), 48-52.
- Arangino V., Del Giacco G.S. 1995. Metodiche di separazione linfocitaria. En: Dammacco F. editor. Diagnostica immunologica. Estratto da Trattato italiano di medicina di laboratorio Diretto dal Prof. A. Burlina. Italy: Piccin Nuova Libreria s.p.a. P 57-75
- Avendano C., Oehninger S. 2010. DNA fragmentation in morphologically normal spermatozoa: how much should we be concerned in the ICSI era? *Journal of Andrology* (Nov. 18, Epub. Ahead of print).
- Barroso G., Morshedi M., Oehninger S. 2000. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction* (15) 1338-1344.
- Bartoov B., Ben-Barak J., Sneider M., Yogev L., Lightman A. 1991. Sperm motility index: a new parameter for human sperm evaluation. *Fertility and Sterility* (56) 108-112.
- Benchaib M., Braun V., Lornage J. et al. 2003. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate un assisted reproductive technique. *Human Reproduction* (18), 1023-1028.
- Bjorndahl L., Mohammadi M., Pourian M., Soderlund I., Kvist U. 2005. Contamination by seminal plasma factors during sperm selection. *Journal of Andrology* (26) 170-173.
- Bungum M., Humaidan P., Spano M., Jepson K., Bungum L., Giwercman A. 2004. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Human Reproduction* (19) 1401-1408.
- Coetsee K. y Kruger T.F. 2007. Advances in automated sperm morphology evaluation. *Male Infertility*. Cap. 10. 171-180. Informa UK Ltd.
- Cortés-Gutiérrez E.I., Dávila-Rodríguez M.I., López-Fernández C., Fernández J.L., Gosálvez J. 2007. Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urología Española*. (31) 98-109.
- Cragg M.S., Howatt W.J., Bloodworth L., Anderson V.A., Morgan B.P., Glennie M.J. 2000. Complement mediated cell death is associated with DNA fragmentation. *Nature-Cell Death & Differentiation*. (7) 48-58.
- Chemes H.E., Rawe V. Y. 2003. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Human Reproduction Update* (9) 405-428.
- Chohan K.R., Griffin J.T., Lafromboise M., DeJonge Ch.J., Carrell D.T. 2006. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of Andrology* (27) 53-59
- Dey S.K. (2010) How we are born. *J Clin Invest*. (120) 952-955.
- Dirican E.K., Özgün O.D., Akarsu S., Akin K.O., Ercan Ö., Ugurlu, Çamsari Ç., Kanyilmaz O., Kaya A., Ünsal A. 2008. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J. Assisted Reproduction Genet*. (25) 375-381.
- Donnelly E.T., Lewis S.E.M., McNally J.A., Thompson W. 1998. In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertility and Sterility* (70) 305-314.
- Duran E.H., Morshedi M., Taylor S., Oehninger S. 2002. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Human Reproduction* (17), 3122-3128.
- Eggert-Kruse W., Rohr H., Kerbel H., Schwalbach B., Demirakca T., Klinga K., Tilgen W., Runnebaum B. 1996. The Acridine Orange test: a clinically relevant screening method for sperm quality during infertility investigation? *Human Reproduction* (11) 784-789.
- Evenson D.P., Jost L.K., Marshall D., Zinaman M.J., Clegg E., Purvis K., de Angelis P., Claussen O.P. 1999. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction* 1039-1049.

- Evenson D.P., Larson K.L., Jost L.K. 2002. Sperm Chromatin Structure Assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology* (23) 25-43.
- Ferlin A., Raicu F., Gatta V., Zuccarello D., Palka G., Foresta C. 2007. Male infertility: role of genetic background. *Reproductive BioMed Online* (14) 734-745.
- Fernández J.L., Muriel L., Goyanes V., Segrelles E., Gosálvez J., Enciso M., LaFromboise M., De Jonge C. 2005. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility* (84) 833-842.
- Fernández J.L., Muriel L., Rivero M.T., Goyanes V., Vázquez R., Alvarez J.G. 2003. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of Andrology* (24) 59-66.
- Fernández J.L., Vázquez-Gundin F., Delgado A., Goyanes V., Ramiro-Díaz J., De la Torre J., Gosálvez J. 2000. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in Human spermatozoa: technical variants evidences different structural features. *Mutation Research* (253) 77-82.
- Gorczyca W., Gong J., Darzynkiewicz Z. 1993. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Research* (53) 1945-1951.
- Gosálvez J., Fernández J.L., Goyanes V., Lopez-Fernandez. 2006. Análisis de la fragmentación del ADN en espermatozoides mediante el test de dispersión de la cromatina. *Biotech Magazine* 24-37.
- Hurst R.E. y Roy J.B. 1985. Acridine orange male fertility test. *Fertility and Sterility*. (43) 154-155.
- Kruger T.F. y Franken D.R. 2004. Atlas of human sperm morphology evaluation. UK: Taylor & Francis Group. 86 p.
- Kruger T.F., Menkveld R., Stander F.S., Lombard C.J., Van der Merwe J.P., van Zyl J.A., et al. 1986. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* (46) 1118-1123.
- Lopes S., Sun J.G., Jurisicova A., Meriano J., Casper R.F. 1998. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* (69) 528-532.
- Mahfouz R., Sharma R., Thiagarajan A., Kale V., Gupta S., Sabanegh E., Agarwal A. 2010. Semen Characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species. *Fertility and Sterility*. (94) 2141-2146.
- Makhlouf A.A. y Niederberger C. 2006. DNA integrity tests in clinical practice: it is not a simple matter of black and white (or red and green). *Journal of Andrology*. (27) 316-323.
- Menkveld R. 2007. The basic semen analysis. En: Oehninger S.C. y Kruger T.F., editors. Male Infertility. Diagnosis and Treatment. UK: Informa UK Ltd. P 141-170
- Oehninger S., Arslan M., Franken D.R. 2007. Sperm-zona pellucida binding assays. En: Oehninger S.C. y Kruger T.F., editors. Male Infertility. Diagnosis and Treatment. UK: Informa UK Ltd. P 209-223.
- Oehninger S., Franken D.R., Sayed E., Barroso G., Kolm P. 2000. Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. *Human Reproduction Update* (6) 160-168.
- Ombelet W., Bosmans E., Janssen M., Cox A., Vlasselaer J., Gyselaers W., Vanderput H., Gielen J., Pollet H., Maes M., Steeno O., Kruger T. 1997. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. *Human Reproduction* (12) 987- 993.
- Paasch U., Grunewald S., Fitzl G., Glander H.J., 2003. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *Journal of Andrology* (24) 246-252.
- Ramos L. y Wetzels A.M.M. 2001. Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. *Human Reproduction* (16) 1703-1707.
- Rawe V.Y., Uriondo Boudri H., Alvarez Sedó C., Carro M., Papier S., Nodar F. 2010. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reproductive BioMedicine Online* (20) 320-323.
- Said T., Agarwal A., Grunewald S., Rasch M., Baumann T., Kriegel Ch., Li L., Glander H.J., Thomas Jr. A.J., Paasch U. 2006. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biology of Reproduction* (74) 530-537.
- Said T.M., Agarwal A., Zborowski M., Grunewald S., Glander H.J., Paasch U. 2008b. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *Journal of Andrology* (29) 134-142
- Said T.M., Grunewald S., Paasch U., et al. 2005. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reproductive BioMedicine Online* (10) 740-746.

- Sakkas D., Urner F., Bizzaro D. et al. 1998. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Human Reproduction Supplement* (4), 11-19.
- Sánchez I., Mar C., Castilla J.A., Marcos M., Martín I., Galán A., Jiménez M.I., Moreno J.M., Serrano I., García-Cobaleda I., Aulesa C., Lozano V., Sánchez C., de Monserrat J. 2009. Técnicas para la preparación de semen en reproducción asistida. *Documentos de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular* Documento C. Fase 3. Versión 4. P 23- 26.
- Shamsi M.B., Kumar R., Dada R. 2008. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res* (127) 115-123.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* (175) 184-191.
- Spano M., Bonde J., Hjollund H.I., Kolstad H.A., Cordelli E., Leter G. 2000. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertility and Sterility* (73) 43-50.
- Tarozzi N., Bizzaro D., Flamigni C., Borini A. 2007. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reproductive BioMedicine Online* (14) 746-757.
- Vagnini L., Baruffi R.L.R., Mauri A.L., Petersen C.G., Massaro F.C., Pontes A., Olivera J.B.A., Franco Jr. J.G. 2007. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reproductive BioMedicine Online* (15) 514-519.
- van der Steeg JW., Steures P., Eijkemans M.J., Habbeman J.D., van der Veen F., Bossuyt P.M., Hompes P.G., Mol B.W. 2004. Should the post-coital test (PCT) be part of the routine fertility work-up? *Human Reproduction* (19) 1373-1379.
- Weng S.L., Taylor S.L., Morshedi M., Schuffner A., Duran E.H., Beebe S., Oehninger S. 2002. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Molecular Human Reproduction* (8) 984-991.
- WHO. 1999. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press. Fourth edition. 138 p.
- WHO. 2000. WHO manual for the standardized investigation diagnosis and management of the infertile male. Cambridge University Press. 102 p.
- WHO. 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth Edition. Prepublication version. 271 p.
- Williams J.R., Little J.B., Shipley W. 1974. Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA. *Nature* (252) 754-755.
- Winkle T., Rosenbusch B., Gagsteiger F., Paiss T., Zoller N. 2009. The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *J. Assisted Reproduction Genet.* (26) 41-46.
- Zini A. y Libman J. 2006. Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction. *Current Opinion in Urology* (16), 428-432.
- Zini A., Bielecki R., Phang D., Zenzes M.T. 2001. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility* (75) 674-677.

Montevideo, febrero 2009

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA HUMANA

INFORME DE PASANTÍA

Tema: Farmacogenética - Puesta a punto de la identificación de las mutaciones *2 y *3 del gen CYP2C9 mediante técnicas de biología molecular (PCR) y determinación de la prevalencia de estas mutaciones en una población de pacientes uruguayos anticoagulados con warfarina.

Tutor: Dr. Antonio Arago

Cotutor: Dr. Carlos J. Azambuja

Laboratorio: GENIA - Genética Molecular

Dr. Antonio Arago

Dr. Carlos J. Azambuja

Nicolás Estrada

IDENTIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES *2 y *3 DEL GEN CYP2C9

Resumen

*La puesta a punto de técnicas de biología molecular significa transitar un camino que tiene como objetivo final el desarrollo de un análisis molecular robusto, sustentable y repetible. Este fue el caso de la identificación de las mutaciones denominadas *2 y *3 del gen CYP2C9, el cual codifica la principal enzima involucrada en la metabolización del anticoagulante oral warfarina.*

Introducción

El proceso de puesta a punto de la identificación de las mutaciones denominadas *2 (Arg144Cys) y *3 (Ile359Leu) del gen CYP2C9 ubicado en el brazo largo del cromosoma diez (10q24.2) (9) el cual codifica la principal enzima involucrada en la metabolización del principal anticoagulante oral warfarina, comenzó con la búsqueda bibliográfica de material y artículos científicos. El objetivo fue obtener la información necesaria sobre el tema de estudio y de esta manera contar con las herramientas necesarias para comenzar con el trabajo práctico en el laboratorio. Desde un principio se trabajó siguiendo los protocolos de bioseguridad y normas de trabajo del laboratorio.

Objetivo general

Aprendizaje en técnicas de biología molecular y familiarizarse con el trabajo de laboratorio.

Objetivo específico

Puesta a punto de la identificación de las mutaciones *2 y *3 del gen CYP2C9

Materiales y métodos

Síntesis de cebadores o primers

Se sintetizaron cebadores ó primers *2F-5'caatggaagaaatggaaggt3' y *2R-5'gactcataatgaaagatatg3' los cuales amplifican un producto de PCR de 222pb que incluye el polimorfismo *2. A su vez, se sintetizaron los primers *3F-5'tgcacgaggtccagagatgc3' y *3R-5'aatgatactatgaatttgggacttcga3', los cuales involucran la mutación *3 y generan un producto de PCR de 158pb (1).

Purificación de ADN

Se purificó ADN utilizando kits comerciales (Purification Kit Wizard Genomic Promega) a partir de sangre periférica como de mucosa bucal. Mediante el lisado de la membrana plasmática y nuclear, precipitación de proteínas y centrifugado de las muestras se obtuvieron pellets de ADN.

Visualización del ADN

Se realizaron corridas electroforéticas en geles de agarosa a los efectos de cuantificar y verificar el ADN purificado. Estos geles fueron analizados mediante transiluminador UV. El objetivo era comparar las muestras "prueba" con ADNs de concentración conocida y evaluar la concentración de las muestras amplificadas.

Amplificación por PCR

Se amplificaron las muestras en termocicladores (Applied Biosystems) modelo 2720 y (Perkin Elmer) modelo 2400. Se siguieron las siguientes condiciones de ciclado:

5min a 94°C (desnaturalización inicial), 30seg a 94°C, 30seg a 57°C, 30seg a 72°C (35 ciclos), 5min a 72°C (extensión final) (1).

Digestión enzimática de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron sometidos a digestión enzimática con enzimas de restricción. Específicamente la enzima Ava II y Nsil (2) que reconocen los sitios de corte para la mutación *2 y *3 respectivamente. La digestión se llevó a cabo incubando las muestras O.N. (Over Night) a 37°C.

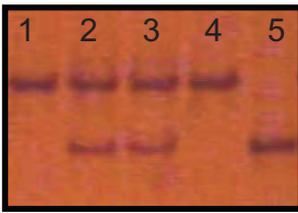
Visualización de los productos de PCR

Luego de la digestión, se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% y posterior visualización de los resultados mediante tinción con nitrato de plata. El clivaje enzimático del fragmento por medio de las endonucleasas produjo patrones de bandas característicos que permitieron identificar los diferentes genotipos (wild type, heterocigoto, homocigoto) para ambas mutaciones.

Resultados

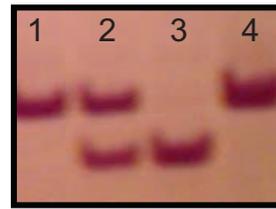
Se obtuvieron todos los genotipos posibles al amplificar diferentes muestras de ADN. Estos fueron *1/*1 homocigoto wild type, *1/*2 heterocigoto para *2, *1/*3 heterocigoto para *3, *2/*2 homocigoto, *2/*3 heterocigoto para ambas mutaciones, *3/*3 homocigoto.

Fig. 1 (Genotipos *2)



Carril 1,4: *2/*2
Carril 2,3: *1/*2
Carril 5: *1/*1

Fig. 2 (Genotipos *3)



Carril 1,4: *3/*3
Carril 2: *1/*3
Carril 3: *1/*1

Conclusión

El desafío que significó poner a punto un estudio de biología molecular que posteriormente se comercializaría fue muy importante.

Todo el proceso que incluye las distintas etapas antes mencionadas llevó un tiempo de aprendizaje previo tanto en forma teórica como práctica con el objetivo de cumplir el trabajo de laboratorio propuesto en la pasantía.

Con respecto al trabajo técnico, fueron necesarios ajustes en las condiciones de amplificación como ser la temperatura de annealing y concentración de los primers, así como concentración de $MgCl_2$.

En relación a la temperatura de annealing, dicho ajuste se refiere a un aumento de la misma en 2 grados C° . Esto permitió reducir las bandas inespecíficas que se observaron en las primeras instancias de prueba.

Al finalizar los ensayos correspondientes se obtuvo el patrón de bandas esperado logrando eliminar completamente las bandas inespecíficas.

Una vez alcanzado este punto en el trabajo, es decir, cuando finalizó la puesta a punto de la técnica, se planteó la posibilidad de realizar un trabajo que mostrara a la comunidad médico-científica por un lado la disponibilidad del estudio del gen CYP2C9 y por otro que respaldara e informara de la frecuencia que existe en la población uruguaya en tratamiento con el anticoagulante warfarina.

Por estos motivos se me encargó la tarea de realizar el siguiente trabajo.

PREVALENCIA DE LOS POLIMORFISMOS *2 Y *3 DEL CYP2C9 EN UNA POBLACION URUGUAYA ANTICOAGULADA CON WARFARINA

Resumen

La warfarina es el principal anticoagulante utilizado en las terapias antitrombóticas. Dado un rango terapéutico estrecho, existen numerosas complicaciones en el control del tratamiento.

La principal enzima involucrada en su metabolización es la codificada por el gen CYP2C9.

Se han descrito polimorfismos en el gen que conllevan a un fenotipo de metabolización alterado. Los metabolizadores lentos requieren dosis menores para alcanzar la anticoagulación.

Hemos determinado la prevalencia de los polimorfismos en una población uruguaya anticoagulada con warfarina. A su vez, identificamos pacientes con mayor probabilidad de presentar eventos hemorrágicos clasificándolos según su genotipo.

Genotipificar a los pacientes permite evitar efectos farmacológicos no deseados.

Introducción

La warfarina es el principal derivado cumarínico extensamente utilizado para la prevención y el tratamiento de tromboembolismos. Un amplio rango de dosis es necesario para mantener el INR (Razón Normalizada Internacional) del paciente dentro de los valores terapéuticos.

Un óptimo control de la anticoagulación oral es muy difícil de lograr debido a la gran variabilidad interindividual en los requerimientos de la dosis.

A nivel internacional, se describen y publican complicaciones frecuentes por sangrados en pacientes anticoagulados con warfarina, en un porcentaje que va del 7.6 al 16.5 de cada 100 pacientes por año, con un porcentaje de riesgo de hemorragias severas entre un 1,3 a 4,2 por 100 pacientes por año de exposición. Por supuesto que en todos estos estudios descritos está descartado un cuidadoso seguimiento del paciente anticoagulado mediante el TP con su INR. Diferentes factores como la edad, el sexo, la dieta, medicación concomitante, afectan la respuesta individual a los medicamentos en general y a la warfarina en particular. Algunas de estas diferencias pueden explicarse por variaciones genéticas. (3)

Mecanismo de acción

Los anticoagulantes orales (ACOs) inhiben el ciclo de interconversión de la vitamina K desde su forma oxidada a la reducida.

La vitamina K (vit K) reducida es el cofactor esencial para la síntesis hepática de las denominadas *proteínas vitamina-K dependientes*.

Estas incluyen a factores de coagulación (protrombina, VII, IX, X) y también a proteínas anticoagulantes (proteína C, proteína S y ATIII). Los ACOs inducen síntesis defectuosa de todas las proteínas vit K dependientes. Sin embargo, se ha demostrado que su efecto anticoagulante se debe principalmente a la disminución de los niveles plasmáticos de protrombina funcional.

La vit K también puede ser reducida por una vía alterna dependiente de NADH. Esta vía no es inhibida por los ACOs, y opera con niveles plasmáticos de vit K muy altos. Lo anterior explica por qué los pacientes con suplementos de esta vitamina (ej. nutrición parenteral), se hacen “refractarios” a los ACOs (4).

Farmacocinética

Su buena solubilidad en lípidos les permite ser absorbidos rápida y completamente desde el tubo digestivo, y explica por qué son capaces de traspasar la barrera placentaria. El acenocumarol tiene una vida media de 9 horas, y la warfarina de 36 horas. En el plasma circulan unidos a albúmina en un 98%, de la cual se liberan para entrar a los hepatocitos, donde alteran la síntesis de proteínas y son metabolizados (por oxidación).

Los residuos se eliminan por vía renal. Numerosos fármacos interaccionan con los ACOs, alterando su absorción (colestiramina), o su metabolismo hepático (retardan el metabolismo: amiodarona, fenilbutazona, metronidazol, cotrimoxazol, cimetidina, omeprazol; aceleran el metabolismo: fenobarbital, carbamazepina, rifampicina, griseofulvina). Otros fármacos interactúan con farmacodinamia de los ACO, potenciando su efecto anticoagulante: AINEs (antiplaquetarios); antibióticos de amplio espectro (reducen la producción de vit K por las bacterias intestinales); tiroxina (aumenta el catabolismo de los factores de coagulación). Las enfermedades también pueden modificar la respuesta a los ACO: en la pancreatitis crónica y el síndrome de mal absorción se reduce la absorción de vit K desde los alimentos; la fiebre y el hipertiroidismo aumentan el catabolismo de los factores de coagulación; en el daño hepático crónico la síntesis de factores de coagulación está disminuida (4).

Indicación terapéutica

Se pueden usar en prevención secundaria o en el tratamiento de la trombosis venosa profunda (TVP) y la embolia pulmonar.

En pacientes con arritmias cardíacas (arritmia completa por fibrilación auricular o *flutter* auricular) o con válvulas cardíacas mecánicas se usa para prevenir la embolización sistémica. La dosis del ACO debe ajustarse según el INR, por las variaciones del efecto anticoagulante obtenido en un mismo paciente (enfermedades asociadas, interacción con otros fármacos). Por lo antes mencionado, la indicación del tratamiento con ACOs, debe ser individualizada, ya que el riesgo de sangrado y el beneficio obtenido de la terapia, dependen del estricto seguimiento de la pauta de dosificación señalada por el especialista (4).

Sistema Citocromo P450

La gran mayoría de los medicamentos poseen características lipofílicas para promover el pasaje de dicho medicamento a través de las membranas celulares a su sitio de acción. Estas características lipofílicas sin embargo, dificultan la eliminación del organismo. Consecuentemente, drogas lipofílicas deben ser biotransformadas en metabolitos más hidrofílicos para facilitar su eliminación y excreción. El sistema citocromo P450 es un grupo de enzimas que son responsables de la metabolización de muchas sustancias endógenas y exógenas, incluyendo el 40% a 50% de todos los medicamentos disponibles actualmente, transformándolos en sustancias más hidrofílicas (5).

A partir de 1996 se estableció un criterio de clasificación y de nomenclatura para el sistema citocromo P450, CYP es la abreviatura de dicho citocromo para todos los mamíferos. Las familias de enzimas que comparten más del 40% de homología en su secuencia aminoacídica se las designa con un número a continuación de CYP, por ej. CYP2. Cuando una subfamilia de estas enzimas comparte más del 55% de homología, se las identifica con una letra mayúscula a continuación del nº de la familia, por ej. CYP2C. Y por último, cada miembro de la subfamilia es codificado por un gen y son designadas por un nº seguido de la descripción de la subfamilia, por ej. CYP2C9.

Un asterisco y un nº seguido del asterisco designa un alelo, por ej, *1, *2. El alelo *1 para el CYP2C9, así como en muchos otros casos es conocido como el tipo salvaje ó normal e implica una actividad enzimática normal. Ahora bien, se denominó CYP2C9*2 a uno de los polimorfismos y CYP2C9*3 a otro. Existen más variantes alélicas para el CYP2C9 pero su importancia en la metabolización de fármacos, específicamente de la warfarina no ha alcanzado el nivel de las mutaciones mencionadas en este trabajo.

CYP2C9

La warfarina está principalmente metabolizada por la enzima CYP2C9. Esta enzima es codificada por el gen ubicado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q24.2). Se han descrito polimorfismos genéticos en el gen que codifica para la CYP2C9, es decir que existen distintas variantes dentro de la población, determinando alteraciones en su actividad enzimática. Estas variaciones o polimorfismos, alteran la actividad catalítica de la enzima ocasionando diferencias interindividuales en el metabolismo de la warfarina y por lo tanto en sus niveles plasmáticos. Se ha establecido que la CYP2C9*2 demuestra una actividad enzimática (In vitro) del 12% respecto de la CYP2C9*1 (wild type). Menor aún es la capacidad catalítica para la CYP2C9*3 que alcanza solo el 5% (6,7).

La genotipificación permite conocer rápidamente el fenotipo de un individuo que puede ser metabolizador normal ó metabolizador lento (poor metabolizer) para la warfarina, perfil que será constante a lo largo de toda su vida.

Se observan variaciones de la prevalencia de las mutaciones en los diferentes grupos étnicos, presentando los máximos valores la población caucásica mientras que la población asiática y africana prácticamente no presentan dichas mutaciones (8).

Objetivo

Determinar la prevalencia de las mutaciones *2 y *3 del CYP2C9 en pacientes adultos uruguayos anticoagulados con warfarina.

Objetivos específicos

Identificar dentro de la población en estudio, individuos con riesgo moderado y alto.

Comparar las frecuencias obtenidas con frecuencias presentes en trabajos similares.

Materiales y métodos

Extrajimos el ADN utilizando el kit comercial (DNA Purification Kit Wizard Genomic Promega) tanto de sangre periférica como de mucosa bucal de 198 pacientes anticoagulados de los siguientes centros de salud participantes. Hospital de Clínicas, Hospital Militar y Sanatorio Americano.

Se seleccionaron las muestras de los bancos de sangre de las instituciones participantes que seguían los siguientes criterios de inclusión: - Los pacientes estuvieran en tratamiento de anticoagulación y que el anticoagulante utilizado fuese warfarina.

Con respecto a los pacientes a los que se les tomaron muestras de mucosa bucal, los mismos firmaron un consentimiento aceptando que las muestras se incluirían en el presente trabajo y solo en el mismo.

Determinamos las mutaciones amplificando las regiones específicas del genoma mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior digestión O.N. (Over night) a 37°C con las correspondientes enzimas de restricción Ava II y Ava III. Posteriormente visualizamos los productos de amplificación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% y tinción con nitrato de plata.

Luego interpretamos los resultados de cada paciente.



Fig 1. Visualización de los productos de amplificación. Carril 1 y 4: Individuos normales *1/*1. Carril 2 y 5: Individuos heterocigotos *1/*2 / *1/*3 para CYP2C9 respectivamente. Carril 3 y 6: Individuos homocigotos *2/*2 / *3/*3.

Mediante una prueba de comparación de proporciones se estudió la diferencia porcentual de individuos de sexo masculino y femenino.

Prueba de hipótesis para comparación de proporciones

$$H_0: p_{\text{hombres}} = 0,5$$

$$H_1: p_{\text{hombres}} \neq 0,5$$

Se realizó una prueba de independencia para estudiar la asociación entre el sexo y el genotipo.

Prueba de independencia

H_0 : El sexo y el genotipo son independientes

H_1 : El sexo y el genotipo no son independientes

Para todas las pruebas se utilizó un nivel de significación de $\alpha = 0,05$.

Resultados

En primer lugar identificamos el porcentaje de pacientes masculinos y femeninos, presentando un 56,56% y 43,44% respectivamente (Figura 2).

Resultado de la comparación de proporciones fue: $p_{\text{hombres}} = 0,5656$, $p = 0,389$, por lo que no rechazamos H_0

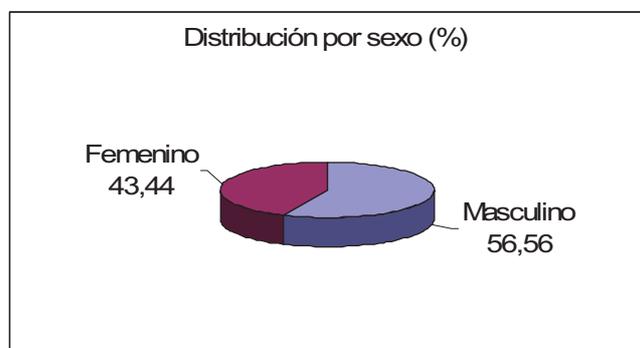
Es decir, que no existen diferencias significativas en las proporciones de sexos.

Fig. 2

Al estudiarse la asociación entre el sexo y el genotipo se calculó un estadístico Chi-cuadrado igual a 3,025 (valor- $p = 0,388$).

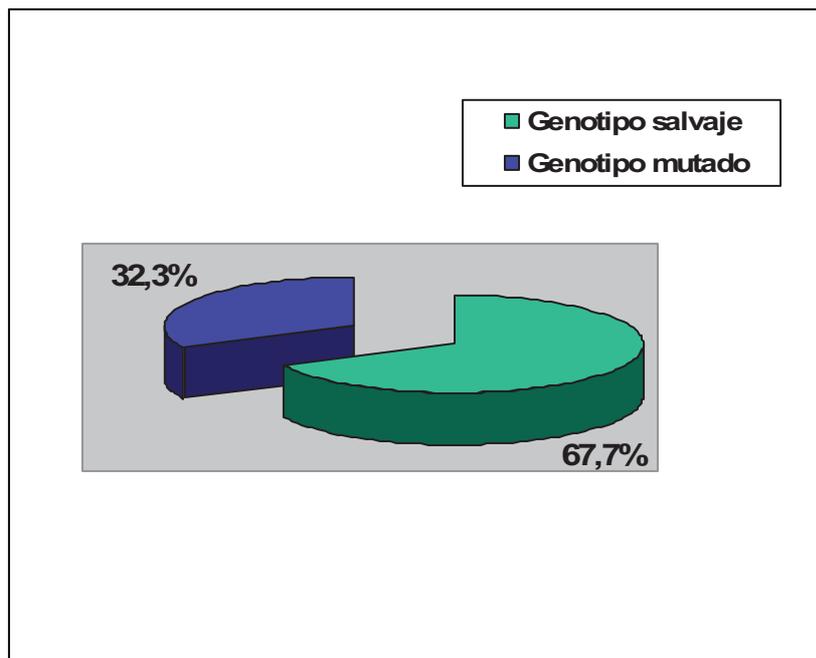
Por lo que no rechazamos H_0 .

Se desprende que el sexo y el genotipo no están asociados.



Encontramos que 134 pacientes (67.7%) presentaron genotipo salvaje (wild genotype) *1/*1, mientras que 64 pacientes (32.3%) resultaron mutados (Figura 3). Dentro de la población de mutados obtuvimos 38 pacientes (19.2%) heterocigotos *1/*2 y 16 pacientes (8.1%) heterocigotos *1/*3. Finalmente 4 pacientes (2.0%) eran homocigotos *2/*2 y 6 pacientes (3.0%) presentaban mutaciones tanto para el CYP2C9*2 como CYP2C9*3 con genotipo *2/*3. No obtuvimos pacientes (0.0%) homocigotos *3/*3.

Fig. 3



Analizamos nuestros resultados y los comparamos con trabajos similares en otras regiones mediante estudios estadísticos. Se estudió la relación entre estas variables mediante el estadístico chi-cuadrado calculado a partir de la siguiente tabla:

Genotipo * Región

Count	Región					Total
	Italia	Suecia	Reino unido	Washington	Montevideo	
Genotipo *1/*1	54	280	62	136	134	666
*1/*2	15	73	19	30	38	175
*1/*3	16	47	15	20	16	114
*2/*2	2	13	0	4	4	23
*2/*3	4	9	3	4	6	26
*3/*3	2	8	1	6	0	17
Total	93	430	100	200	198	1021

*Italia: (2), *Suecia: (10), *Reino Unido: (10), *Washintong: (9)

A partir de 5 muestras correspondientes cada una a una región se estudió la presencia de 6 variantes genotípicas distintas.

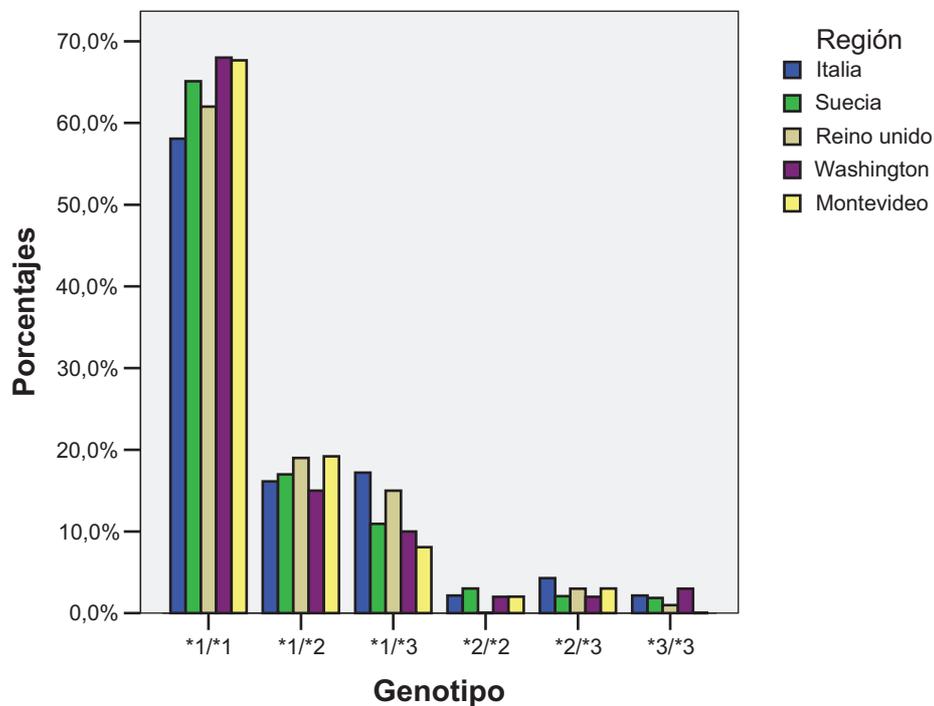
Las regiones consideradas fueron: Italia (93 casos), Suecia (430 casos), Reino Unido (100 casos), Washington (200 casos) y Montevideo (198 casos); y a los distintos genotipos los llamamos *1/*1, *1/*2, *1/*3, *2/*2, *2/*3, *3/*3.

Se calcularon los porcentajes de individuos pertenecientes a cada genotipo en las distintas regiones, y se realizó para cada porcentaje el intervalo de confianza al 95%.

Genotipo * Región

% within Región		Región					Total
		Italia	Suecia	Reino unido	Washington	Montevideo	
Genotipo	*1/*1	58,1%	65,1%	62,0%	68,0%	67,7%	65,2%
	*1/*2	16,1%	17,0%	19,0%	15,0%	19,2%	17,1%
	*1/*3	17,2%	10,9%	15,0%	10,0%	8,1%	11,2%
	*2/*2, *2/*3 y *3/*3	8,6%	7,0%	4,0%	7,0%	5,1%	6,5%
Total		100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Fig. 4



En el momento de realizar los intervalos de confianza fue necesario unir a aquellos genotipos menos frecuentes.

Genotipo\Región	Italia	Suecia	Reino Unido	Washington	Montevideo
*1/*1	(48,0-68,1)	(60,6-69,6)	(52,5-71,5)	(61,5-74,,5)	(61,1-74,2)
*1/*2	(8,6-23,6)	(13,4-20,5)	(11,3-26,7)	(9,9-19,7)	(13,7-24,7)
*1/*3	(9,5-24,9)	(8,0-13,9)	(8,0-22,0)	(5,8-14,0)	(4,3-11,9)
*2/*2, *2/*3 y *3/*3	(2,9-14,3)	(4,6-9,4)	(0,2-7,8)	(3,4-10,4)	(2,0-8,1)

En el cuadro anterior podemos ver como no existe diferencia significativa ya que los intervalos de confianza de un mismo genotipo en distintas regiones tienen puntos en común, por ejemplo si en Italia el porcentaje de individuos con genotipo *1/ *1 está entre el 48,0 y el 68,1 %, y en Suecia entre el 60,6 y el 69,6 %, entonces podría ser incluso mayor el porcentaje en Italia que en Suecia, ya que no sabemos ni en Italia ni en Suecia cual es el verdadero valor del porcentaje, sólo sabemos que está dentro del intervalo.

Así como en el ejemplo, se puede ver que al comparar cualquier otro par de intervalos dentro de cada genotipo el resultado será el mismo. Se presenta la misma distribución de genotipos en las distintas regiones.

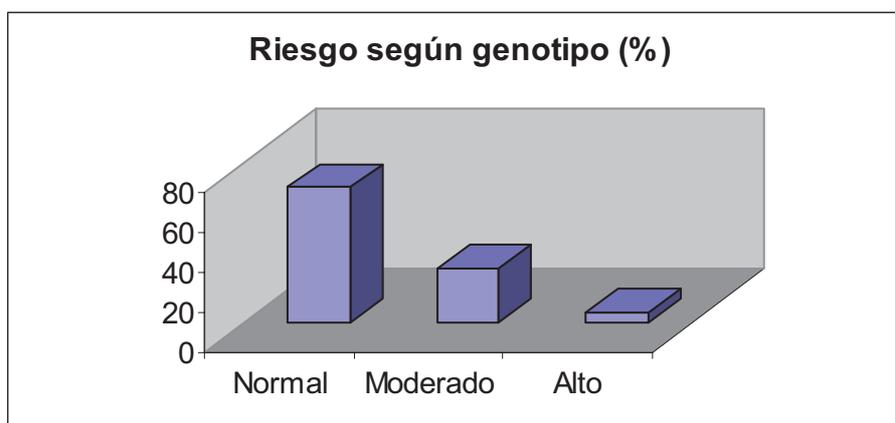
Dada las frecuencias genotípicas obtenidas hemos clasificado a la población estudiada en tres subgrupos. Con el 67.7% encontramos a los pacientes cuyo genotipo es *1/*1, es decir presentan un riesgo normal. El 27.3% de la población, involucra a los pacientes heterocigotos tanto *1/*2 como *1/*3, clasificando a este subgrupo como pacientes con riesgo moderado.

Por último, los pacientes heterocigotos para ambas mutaciones *2/*3 y los homocigotos *2/*2 que representan el 5% del muestreo son los clasificados como población de alto riesgo (Figura 5).

Tabla 2. Clasificación de riesgo (%)

Normal	67,7
Moderado	27,3
Alto	5

Fig. 5



Discusión

Luego de genotipificar 198 pacientes uruguayos, de los cuales el 56,56% eran de sexo masculino y el 43,44% de sexo femenino, que a su vez se encontraban en tratamiento antitrombótico con warfarina podemos afirmar que nuestras frecuencias resultaron similares a las frecuencias genotípicas para el CYP2C9 observadas en otros trabajos científicos (2, 9, 10).

Concluimos que no existe diferencias en la presencia de los distintos genotipos por región, ya que el estadístico chi-cuadrado fue 20,298 (valor-p = 0,439). Sin embargo al ser muy pequeña la cantidad de individuos pertenecientes a los genotipos *2/*2, *2/*3 y *3/*3 en cada región no es posible comparar esos genotipos.

Desde el punto vista genotípico hemos identificado grupos de pacientes en los cuales el riesgo de padecer eventos de sangrado esta aumentado. Es decir, que a dosis relativamente bajas de warfarina esos pacientes tienen mayores probabilidades de presentar efectos adversos como ser eventos hemorrágicos diversos.

Aunque no está indicado realizar un screening general en la población por motivos económicos principalmente, si parece apropiado genotipificar al paciente que vaya a recibir un tratamiento de anticoagulación con warfarina, logrando alcanzar dosis terapéuticas rápidamente, así como evitar efectos farmacológicos adversos de complejidad variable, incluso alcanzando riesgo de muerte.

En el caso de pacientes cuyo INR no es estable o en pacientes con antecedentes hemorrágicos, la determinación del genotipo resulta de vital importancia a los efectos de corregir el tratamiento y mejorar la calidad de vida del paciente anticoagulado.

Vale decir que los avances en el campo de la biología molecular han contribuido de tal forma que el especialista cuenta con modernas herramientas para lograr tratamientos más efectivos.

Agradecimientos

Agradecemos al Hospital de Clínicas, Sanatorio Americano y al Hospital Militar por su colaboración en la recolección de las muestras. Agradecemos especialmente a Química Ariston Uruguay S.A. quien apoyó económicamente el proyecto.

Bibliografía

1. **Hermida J.** Differential effects of CYP2C9*3 and CYP2C9*2 variants of cytochrome P-450 CYP2C9 on sensitivity to acenocoumarol. *Blood*, 1 June 2002, Vol. 99, No. 11, pp. 4237-4239
2. **Scordo M, Pengo V, et al.** Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on warfarin maintenance dose and metabolic clearance. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* Volume 72, Number 6
3. **Blann A, Hewitt J, Siddiqui F, Bareford D.** Racial background is a determinant of average warfarin dose required to maintain the INR between 2.0 and 3.0. *Br J Haematol* 1999; 107: 207–209.
4. **Trejo C.** Anticoagulantes: Farmacología, mecanismos de acción y usos clínicos. *Cuad. Cir.* 2004; 18: 83-90.
5. **Loebstein R, Yonath H, Peleg D, et al.** Individual variability in sensitivity to warfarin. Nature or nurture. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70:159-64.
6. **Linder WM.** Genetic mechanisms for hypersensitivity and resistance to the anticoagulant warfarin. *Clin Chim Acta* 2001; 308: 9–15.
7. **Tayyaba Khan, Farhad Kamali.** Warfarin sensitivity: be aware of genetic influence. *Age and Ageing* 2003; 32: 226–227
8. **Takahashi H, Echizen H.** Pharmacogenetics of CYP2C9 and interindividual variability in anticoagulant response to warfarin. *Pharmacogenomics J* 2003; 3(4): 202-14.
9. **Mitchell K. Higashi;** Association Between CYP2C9 Genetic Variants and Anticoagulation-Related Outcomes During Warfarin Therapy. *JAMA.* 2002;287(13):1690-1698.
10. **Ann K Daly,** CYP2C9 polymorphism and warfarin dose requirements. *Br J Clin Pharmacol.* 2002 April; 53(4): 408–409.

Paula Virginia González Rodríguez

**“Introducción a la Biomecánica Humana
con perfil clínico y deportivo”**

**I - COMPARACIÓN DEL EQUILIBRIO DINÁMICO DURANTE LA MARCHA
ENTRE DISTINTAS POBLACIONES DE INDIVIDUOS**

**II - ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA
MUSCULAR MÁXIMA RELATIVA Y LA POTENCIA MECÁNICA MAXIMA EN
DOS TIPOS DE SALTOS VERTICALES EN ATLETAS**

Tutor de licenciatura: Dr. Luis Calegari

Tutores de pasantía: MsC. Gabriel Fábrica y PhD. Richard Fariña.

**LICENCIATURA EN BIOLOGIA HUMANA
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, URUGUAY
2010**

I - COMPARACIÓN DEL EQUILIBRIO DINÁMICO DURANTE LA MARCHA ENTRE DISTINTAS POBLACIONES DE INDIVIDUOS

1 – Introducción.

1.1 - Análisis cinemáticos en biomecánica.

La cinemática es una de las metodologías por la cual se puede estudiar de modo cuantitativo el movimiento del cuerpo humano, tanto en el área básica como aplicada análisis con base en variables cinemáticas han permitido realizar inferencias paleontológicas [1], estudios en zoología [2, 3], en el deporte [4, 5, 6] y en la medicina [7, 8, 9, 10, 11]. Estos análisis abordan el problema desde una perspectiva espacio-temporal, siendo algunas de las variables de interés la posición, velocidad y aceleración lineal o angular de los segmentos corporales o del cuerpo en su totalidad [12].

Comúnmente en los estudios de tipo cinemático se recurre al análisis de imágenes de video o cinemetría. Esto consiste básicamente en el rastreo de marcadores colocados en puntos anatómicos de referencia en el cuerpo del individuo que, en última instancia, permitirá la reconstrucción 2D o 3D de su posición en el tiempo. Para este abordaje se debe modelar el cuerpo como un sistema de segmentos rígidos con muchos grados de libertad [12, 13, 14, 15].

En la obtención de las reconstrucciones pueden ser utilizados diversos *software*. Los laboratorios de la región comúnmente recurren al Dvideow (*Digital for Video for Biomechanics Windows 32 bits*) [15, 16].

Por otra parte, en la determinación de las variables de interés a partir de los resultados de la reconstrucción es habitual utilizar sistemas de análisis de datos como el SAD (*Laboratório de Medições Mecânicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*) y MatLab 7.0[®] (*Mathworks, Inc.*).

Los estudios biomecánicos de tipo cinemático vienen siendo desarrollados en forma creciente en los últimos años tanto a nivel mundial como regional. En nuestro país se han comenzado a desarrollar una serie de proyectos de investigación en cinemática del movimiento humano, uno de ellos es un proyecto CSIC de iniciación a la investigación “Estudio biomecánico del equilibrio dinámico durante la marcha en el adulto mayor con alto riesgo de caídas”. En el marco del mismo se ha realizado parte de la instancia de pasantía que aquí se presenta.

1.2 - El problema estudiado y su importancia.

Las caídas en adultos mayores representan una importante causa de morbilidad y mortalidad [17, 18]. Dos estudios clásicos [19, 20] reportaron que aproximadamente el 17% de los adultos mayores sufren 1 o más caídas por año, mientras que estudios más recientes hacen referencia a porcentajes aún mayores (del 20 al 40%) [21 a 25]. También se ha destacado que la frecuencia de las caídas aumenta en individuos adultos mayores que se encuentran en hospitales y casas de salud [21, 26, 27].

La *Guideline for the Prevention of Falls in Olders Persons* [28] menciona que en el transcurso de un año el 65% de los adultos mayores con más de 65 años ha reportado al menos una caída anual. Además, la cantidad de caídas anual incrementa un 50% en adultos con más de 75 años [29].

Las caídas, las lesiones asociadas con éstas y la inmovilidad se encuentran entre las razones más comunes para la atención médica en el adulto mayor [19, 30]. Las caídas causan lesiones que pueden llevar a la hospitalización de los adultos mayores de 65 años de edad [31], determinan el 4 % del ingreso a hospitales y el 14% de los ingresos a emergencia [32, 33, 34]. Además, los eventos de caída en general determinan un intenso miedo a sufrir nuevas caídas lo que conduce a una disminución de la independencia del adulto mayor disminuyendo así su calidad de vida [32, 33, 34].

Muchos factores de riesgo han sido asociados con las caídas en adultos mayores [33, 34, 35], incluyendo debilidad muscular, depresión y alteración de la función sensorial. Diferentes autores han sugerido que muchas veces esas patologías pueden ser subclínicas y no ser reconocidas por el paciente y el equipo de salud [36, 37].

Las caídas en el adulto mayor por representar un problema importante en la salud pública con ramificaciones sociales y económicas [33, 34] han determinado el planteo de estudios que tienen como objetivo reducir y detectar el riesgo de caída. Ellos han sido clínicamente evaluados presentando diferente grado de éxito [38, 39, 40, 41].

Estudios de estabilidad cuando el individuo está parado han mostrado que los adultos mayores tienden a incrementar su balanceo en la dirección antero-posterior y medio-lateral (en comparación con adultos jóvenes), y además cuentan con una respuesta anormal ante desestabilizaciones del tronco [36, 42, 43, 44]. El incremento del balanceo medio-lateral en situación estática ha sido correlacionado con el incremento del riesgo de caída [42, 44]. No obstante, las caídas frecuentemente ocurren durante la marcha y no en situación estática [45, 46].

La evaluación del riesgo de caída durante la marcha habitualmente se realiza de forma cualitativa. Varios de estos abordajes han determinado que en los adultos mayores con alto riesgo de caídas existe una tendencia a tener un paso inestable [47, 48]. Coincidiendo con esta afirmación algunos estudios de tipo cuantitativo han determinado que la baja variabilidad en la duración del ciclo de marcha refleja seguridad y representa un indicador de estabilidad [49, 50, 51], y la alta variabilidad en la duración del ciclo de marcha es indicador de inestabilidad y riesgo de caída [39, 52].

Hasta el momento la evaluación del equilibrio durante la marcha no cuenta con una variable que permita su cuantificación en forma directa y rápida. El establecimiento de parámetros objetivos que permitan una rápida evaluación del equilibrio durante la marcha podría ser de gran importancia en la prevención, el diagnóstico y la rehabilitación [51, 52, 53, 54].

Medidas directas de equilibrio durante el movimiento de diferentes diseños mecánicos pueden ser obtenidos mediante el establecimiento de la posición del centro de masa del cuerpo (COM) y su relación con la base de sustentación [55]. Este abordaje, que ha sido aplicado al estudio de la locomoción animal [56, 57] y considerado en el diseño de robots [58], podría contribuir en la evaluación del equilibrio en humanos y la predicción del riesgo de fallas.

El objetivo general del proyecto en el que se enmarcó la pasantía fue cuantificar el equilibrio de adultos mayores que tienen alto riesgo de sufrir caídas e identificar causas que alteren el equilibrio a fin de aportar herramientas útiles al médico en la toma de decisiones clínicas. El equilibrio durante cada fase de soporte (unipodal y bipodal) fue analizado mediante un índice que fue calculado considerando la relación entre la base de sustentación y las coordenadas del COM en el plano del piso. Los datos de velocidad, duración, variabilidad temporal del ciclo de marcha y equilibrio para un grupo de ancianos caedores fueron comparados con los datos de individuos jóvenes adultos saludables y ancianos no caedores todos caminando a velocidad auto seleccionada en piso plano.

2 - Materiales y métodos.

2.1 - Características de la muestra.

La población de estudio del proyecto se compuso de tres grupos de individuos, el grupo 1 representado por adultos jóvenes saludables ($n=9$, edad $21,67 \pm 2,55$ años y masa $65,44 \pm 14,69$ kg), el grupo 2 adultos mayores de 65 años no-caedores ($n=9$, edad $66,51 \pm 3,40$ años y masa $70,34 \pm 8,16$ kg) y el grupo 3 compuesto por adultos mayores de 65 años en cuya historia clínica contara un registro reciente de caída ($n=9$, edad $67,82 \pm 4,30$ años y masa $71,50 \pm 6,30$ kg).

2.2 - Preparación de los individuos.

Los individuos fueron preparados en el Gimnasio de Fisiatría del Hospital de Clínicas, allí se les informó las características y objetivos del experimento, se les presentó consentimiento informado y se realizó una evaluación clínica por parte de un médico del servicio. Posteriormente fueron vestidos con vestimenta negra opaca ajustada al cuerpo y se procedió a la colocación de los 18 marcadores de referencia. Estos marcadores son esferas de poliamida que se ubican en los puntos anatómicos de referencia a los cuales se les adjudicó un orden de identificación (Figura 1).



Número de marcador	Referencia anatómica
1	Quinto metatarsiano derecho
2	Maléolo externo derecho
3	Cóndilo femoral derecho
4	Trocánter mayor derecho
5	Acromiion derecho
6	Esfenoides derecho
7	Epicóndilo externo del húmero derecho
8	Apófisis estiloides del radio derecho
9	Cabeza del tercer metacarpiano derecho
10	Quinto metatarsiano izquierdo
11	Maléolo externo izquierdo
12	Cóndilo femoral izquierdo
13	Trocánter mayor izquierdo
14	Acromiion izquierdo
15	Esfenoides izquierdo
16	Epicóndilo externo del húmero izquierdo
17	Apófisis estiloides del radio izquierdo
18	Cabeza del tercer metacarpiano izquierdo

Figura 1. Disposición de los marcadores que serán utilizados para la reconstrucción tridimensional del movimiento.

2.3 - Preparación del ambiente.

La adquisición de datos fue realizada en una pasarela de seis metros de longitud y un metro de ancho. Para acentuar el contraste entre los marcadores y el fondo algunos sectores fueron cubiertos con una tela negra opaca. Por los mismos motivos se colocó una alfombra negra opaca.

Las filmaciones se obtuvieron utilizando tres cámaras de video Sony DCR-H28E ubicadas sobre trípodes UNOMAT SVA 950. Ellas fueron dispuestas formando ángulos de 90 grados entre sí lo que permitió filmar al individuo desde cada plano sagital y el frontal.

En este experimento la cámara que permite visualizar al individuo desde el plano frontal es llamada cámara 1, la que brinda una visión del plano sagital derecho del individuo se designa como cámara 2 y la cámara que ofrece la imagen del individuo desde el plano sagital izquierdo es llamada cámara 3.

2.4 - Adquisición de datos antropométricos y filmación de los individuos.

Previo a la filmación de los individuos durante la marcha se determinaron ciertas variables antropométricas necesarias para los cálculos previstos: masa, longitud de miembro inferior (medida desde el piso hasta trocánter mayor), altura de los marcadores colocados en quintos metatarsianos y maléolos.

Por otra parte, dado que el encendido de las cámaras no es simultáneo se debió emitir una señal sonora con un silbato. Esta señal, como se verá más adelante, permite sincronizar temporalmente las 3 cámaras.

Cada individuo con los marcadores colocados realizó 5 pasadas a velocidad de marcha auto-seleccionada por la parte media del volumen de filmación.

Las imágenes obtenidas fueron capturadas con el programa Virtual Dub-MPEG2.1.6.19[©] (Software libre).

2.5 - Filmación del calibrador.

Previo y posterior a la pasada de los individuos se filmó una estructura metálica (calibrador) que cuenta 45 marcadores espaciales (esferas de poliamida). El calibrador se coloca en la pasarela a los efectos determinar un volumen de filmación y se define en él el origen de un sistema de coordenadas con tres ejes ortogonales entre sí: X (que coincide con la línea de progresión), Y (vertical) y Z (transversal).

Todos los parámetros de la cámara (distancia focal, el *zoom*, etc.) se mantuvieron constantes durante la filmación del individuo y del calibrador.

2.6 - Proceso de digitalización.

Las imágenes digitales que se visualizan en la pantalla de una computadora están formadas por una matriz rectangular de píxeles y cada *pixel* tiene coordenadas x e y e información de color. Así es que en una serie de

imágenes bidimensionales ordenadas secuencialmente el movimiento de un marcador se puede determinar si se establecen las coordenadas x e y de los *pixels* que lo componen en cada una de ellas.

El objetivo del proceso de digitalización es determinar en la pantalla las coordenadas (x,y) de cada marcador del individuo, cuadro a cuadro, manteniendo la identidad de cada marcador durante una secuencia y para cada cámara. Para ello se utilizó el programa Dvideow 6.3 (*Digital for Video for Biomechanics Windows 32 bits*, Laboratorio de Instrumentación para Biomecánica Universidad de Campinas). Este programa permite cargar imágenes de video capturadas y separar los campos de imágenes, así la información obtenida con las cámaras digitales (frecuencia=25 cuadros /segundo) fue duplicada (frecuencia=50 cuadros/segundo). Las herramientas del programa permiten avanzar cuadro a cuadro, establecer el número de cuadro, identificar señales sonoras, identificar y almacenar las coordenadas (x,y) de los marcadores en cada cuadro, guardar un archivo con la información de las coordenadas (x,y) de los marcadores digitalizados en cada cámara para su posterior transformación en coordenadas espaciales (X,Y,Z) en el proceso de reconstrucción y construir una matriz de transformación que permite obtener las coordenadas espaciales a partir de las coordenadas (x,y) de la pantalla de cada cámara.

El cuadro de sincronismo es el cuadro en la imagen de video donde se identifica por primera vez la señal sonora. Dado que la señal sonora es captada al mismo tiempo por las 3 cámaras sirve como evento temporal que posibilita la sincronización de todas ellas.

Con las tres cámaras sincronizadas se procedió al establecimiento de la secuencia a digitalizar. Se definió el inicio de una secuencia en el cuadro en que el pie derecho del individuo hace contacto con el piso y el final de la secuencia en el cuadro en que el mismo pie vuelve a hacer contacto con el piso. Una vez establecida una misma secuencia en las 3 cámaras se procedió a la digitalización. Para la cámara 1 se establecieron las coordenadas (x,y) de todos los marcadores en todos los cuadros de la secuencia, en la cámara 2 se establecieron las coordenadas (x,y) de los marcadores 1 al 9 y para la cámara 3 la de los marcadores 10 a 18. Este proceso se realizó de modo semiautomático, en algunos casos determinando la posición del marcador de modo manual y en otros de modo automático recurriendo a herramientas del programa.

Por cada secuencia digitalizada se guardaron tres archivos de digitalización, uno por cada cámara, y ellos fueron usados posteriormente en el proceso de reconstrucción 3D.

2.7 - Proceso de calibración.

El objetivo de la calibración es obtener parámetros de transformación que permitan convertir la información de obtenida a partir de las imágenes capturada por cada cámara (coordenadas x, y) en información tridimensional (coordenadas X, Y, Z).

Existen varios procedimientos que permiten la calibración de las cámaras. El procedimiento con que cuenta el programa utilizado en este proyecto se conoce con el nombre de DLT (*Direct Linear Transformation*) y aplica una serie de ecuaciones para cuantificar los parámetros de transformación [59].

$$\begin{aligned} (n_1^k - n_3^k x_i^k) X_i + (n_4^k - n_6^k x_i^k) Y_i + (n_7^k - n_9^k x_i^k) Z_i + n_{10}^k x_i^k &= 0 \\ (n_2^k - n_3^k y_i^k) X_i + (n_5^k - n_6^k y_i^k) Y_i + (n_8^k - n_9^k y_i^k) Z_i + n_{11}^k y_i^k &= 0 \end{aligned}$$

Siendo x_i e y_i las coordenadas en la imagen del i -ésimo punto de un sistema de referencia conocido para cada cámara k ; X_i , Y_i y Z_i son las coordenadas espaciales del i -ésimo punto de referencia y n_h^k ($h=1, \dots, 11$) son los parámetros de la transformación para la k -ésima cámara a ser determinados [60].

Los procedimientos para calibrar involucran al programa Dvideow 6.3. Para cada cámara se digitalizaron todos los marcadores del calibrador, es decir que se obtuvieron las coordenadas x e y de los 45 marcadores en cada cámara. Posteriormente se cargó un archivo "txt" con las coordenadas espaciales que tenían estos marcadores en el volumen de filmación según el sistema de coordenadas establecido. Y finalmente se guardó un archivo de calibración donde aparecen los parámetros de transformación calculados por el programa. Este archivo fue utilizado en el proceso de reconstrucción 3D.

2.8 - Proceso de reconstrucción.

El objetivo de la reconstrucción es la obtención de las coordenadas espaciales (X,Y,Z) de cada marcador en cada cuadro a partir de sus coordenadas en la pantalla (x,y) obtenidas en al menos 2 cámaras.

Los procedimientos de reconstrucción 3D que utiliza el programa DVideow 6.3 se basan en el método DLT. En este proceso se integra la información de las coordenadas de los marcadores en la pantalla (obtenidos en la digitalización) con los parámetros de transformación (obtenidos en la calibración).

Al final de este proceso se obtuvo un archivo de texto con las coordenadas espaciales (X, Y, Z) de cada marcador en cada cuadro de la secuencia. Este archivo fue utilizado para el cálculo de posición de centros de masa parciales (de los segmentos corporales considerados), la posición del COM, la velocidad de ciclo de marcha y del índice de equilibrio (EN).

2.9 - Cálculo de las variables.

Los instantes de apoyo y despegue de cada pie que definen las fases de la marcha fueron determinados directamente de las secuencias de video.

Las coordenadas del COM fueron determinadas a partir de las matrices de reconstrucción 3D en Matlab 7.0[®] (*Mathworks, Inc.*) considerando las coordenadas de los centros de masas parciales de los pies, piernas, muslos, manos, antebrazos, brazos, tronco y cabeza.

Existen sólidas evidencias de que los parámetros inerciales del cuerpo son alterados con la edad y el género [61], así como con la distribución de masa corporal [62]. Esas diferencias marcaron la necesidad de integrar ecuaciones de regresión específicas para la estimación de los parámetros de los segmentos corporales en las ecuaciones para el estudio de movimiento. Por esta razón se utilizaron tres rutinas de Matlab diferentes de acuerdo a la edad y género de los individuos considerando ecuaciones estándar [63] y específicas [61] para el cálculo de los centros de masa de los segmentos corporales y COM.

2.9.1 - Velocidad de ciclo de marcha.

La velocidad media de cada ciclo de marcha fue determinada realizando la primera derivada de la posición del COM en el eje X respecto del tiempo.

2.9.2 - Duración del ciclo de marcha.

La duración del ciclo de paso (tiempo desde el contacto de un pie hasta el contacto del mismo pie) fueron determinados de las imágenes para cada ciclo

2.9.3 - Variabilidad temporal del ciclo de marcha.

Se analizó para cada individuo tomando en cuenta la duración todos los ciclos de marcha realizados y calculando la media y desvío estándar del conjunto.

2.9.4 - Estimación del equilibrio mediante EN.

En el marco del proyecto en que se enmarca la pasantía se propuso una variable que permita estimar directamente la situación de equilibrio del individuo a medida que camina. Esta variable relaciona la proyección del centro de masa en el plano del piso con el centro y borde de circunferencias que representan el área de sustentación en cada instante.

Las circunferencias que representan la base de sustentación fueron definidas siguiendo dos criterios diferentes para el caso de apoyo bipodal (apoyo doble) y apoyo unipodal (apoyo simple). Durante la situación de apoyo doble el diámetro de la circunferencia se define por la distancia entre los marcadores ubicados en los quintos metatarsianos, siendo la distancia media entre ellos el centro de la circunferencia. En el apoyo simple el centro de la circunferencia de la base de sustentación corresponde al punto en que se proyecta el centro de masa del pie en el plano del piso. El radio de la circunferencia corresponde a la distancia entre el centro y el marcador ubicado en el quinto metatarsiano.

Se considera una situación de máximo equilibrio cuando la proyección del centro masa total del cuerpo coincide con el centro del base de sustentación, para esta situación $EN=1$. De acuerdo a los criterios presentes en la bibliografía (estudios de equilibrio en animales y robótica) [56, 57, 58] el equilibrio va disminuyendo a medida que la proyección de centro de masa se acerca al borde de la circunferencia que representa la base de sustentación, de manera que cuando dicha proyección coincide con el borde $EN = 0$ y cuando se proyecta fuera de ella $EN < 1$ (Figura 2).

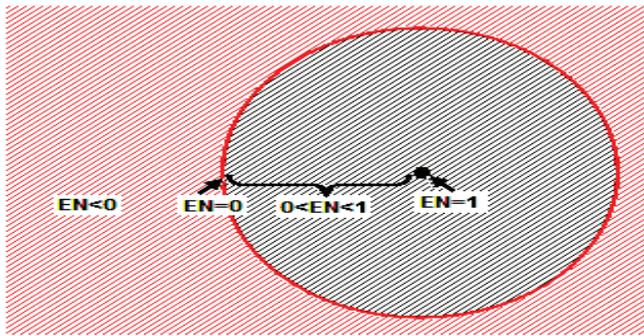


Figura 2- Esquema de la base sustentación (círculo) y valores de EN en relación a ésta. Si el centro de masa del cuerpo (COM) se proyecta sobre el centro de la base de sustentación el EN es 1. Si el COM se proyecta entre el centro y el borde de la base de sustentación el EN toma valores mayores que 0 y menores que 1. Si el COM se proyecta sobre el borde de la base de sustentación EN es 0. Si el COM se proyecta fuera del área de sustentación EN toma valores negativos, más negativos cuanto más alejado del borde.

Una vez ejecutada la rutina de Matlab se obtuvo información de la proyección del centro de masa en la base de sustentación y una columna de datos con los valores de EN en el tiempo.

2.10 - Procedimientos estadísticos.

Los procedimientos estadísticos fueron realizados en el programa SPSS (versión 12.01). Se realizaron cálculos de estadística descriptiva para determinar las características generales de los sujetos de estudio (edad y masa), velocidad, duración y variabilidad temporal del ciclo de marcha.

Para la variabilidad temporal del ciclo se consideró el desvío estándar de la duración de los ciclos de marcha de cada sujeto.

Los valores medios de velocidad, duración y variabilidad de ciclo de marcha de los tres grupos fueron comparados mediante test-t para muestras independientes ($\alpha = 0,05$).

Para determinar si EN es una variable que permite identificar los adultos mayores caedores se realizaron comparaciones de los valores promedios, mínimos y máximos de EN entre todos los grupos y para cada situación de apoyo. Para esto último se realizó ANOVA ($\alpha = 0,05$), y test de Bonferroni en los casos pertinentes.

3 – Resultados.

3.1 - Parámetros cinemáticos clásicos.

La tabla 1 resume los resultados de las comparaciones de los parámetros cinemáticos considerados en este trabajo. Los adultos jóvenes presentaron mayor velocidad de marcha que los otros dos grupos considerados. La duración de ciclo de marcha de los adultos mayores no-caedores fue significativamente mayor que la correspondiente para los jóvenes y adultos mayores caedores (quienes no presentaron diferencias entre sí).

La variabilidad temporal del ciclo fue significativamente menor en el grupo de jóvenes en comparación con los valores obtenidos para los dos grupos de adultos mayores (estos no presentaron diferencias significativas entre sí).

Parámetro	Grupos		
	Jóvenes	No caedores	Caedores
Velocidad de ciclo (m/s)	1,36 ± 0,128 *	0,679 ± 0,151	0,650 ± 0,117
Duración de ciclo (s)	1,300 ± 0,106	1,397 ± 0,145 *	1,303 ± 0,054
Variabilidad temporal de ciclo (s)	0,034 ± 0,024*	0,054 ± 0,030	0,050 ± 0,033

Tabla 1. Resultados de velocidad de ciclo, duración de ciclo y variabilidad temporal de ciclo (media y desvío estándar). Para cada variable se señala con asterisco (*) el grupo que presentó diferencia significativa ($p \leq 0,05$) respecto a los demás.

3.2 – Equilibrio.

La variable EN se consideró una medida cuantitativa de la situación de equilibrio del sujeto en cada instante. En la tabla 2 se presentan valores promedios, mínimos y máximos de EN durante situaciones de apoyo doble y apoyo simple en cada grupo estudiado y además se indican los casos en que se encontraron diferencias estadísticas significativas.

Apoyo doble	Jóvenes	Ancianos No caedores	Ancianos Caedores
EN promedio	0,96 ± 0,01	0,95 ± 0,02	0,94 ± 0,05*
EN mínimo	0,92 ± 0,02	0,93 ± 0,04	0,90 ± 0,07
EN máximo	0,99 ± 0,01	0,98 ± 0,01	0,97 ± 0,03*
Apoyo simple	Jóvenes	Ancianos No caedores	Ancianos Caedores
EN promedio	-1,83 ± 0,28	-1,63 ± 0,68	-1,48 ± 0,42*
EN mínimo	-4,33 ± 0,90	-3,40 ± 1,19	-3,23 ± 0,86*
EN máximo	-0,51 ± 0,27	-0,77 ± 0,54	-0,68 ± 0,31

Tabla 2. Resultados de EN promedio, mínimo y máximo (media y desvío estándar) para cada situación de apoyo en los grupos de jóvenes, ancianos no-caedores y ancianos caedores. Con asterisco (*) se indica la presencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre jóvenes y ancianos caedores. Con círculo negro (●) se indica presencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el grupo de ancianos caedores y demás grupos de individuos.

El ANOVA y test Bonferroni mostraron diferencias significativas en los valores promedios y máximos de EN durante el apoyo doble entre el grupo de individuos jóvenes y adultos mayores caedores, los correspondientes valores de los individuos adultos mayores no-caedores no evidenciaron diferencias significativas con ninguno de los grupos antes mencionados. Utilizando los mismos procedimientos estadísticos se evidenció que durante el apoyo simple existieron diferencias significativas en los valores promedios de EN entre los individuos jóvenes y adultos mayores caedores. Además, durante la fase de apoyo simple los valores mínimos de EN del grupo de individuos caedores fue estadísticamente diferente de los demás grupos.

4 - Discusión.

4.1 – Velocidad de ciclo de marcha.

Los valores de velocidad de marcha encontrados para los adultos mayores no-caedores ($0,679 \pm 0,151$) y caedores ($0,650 \pm 0,017$) estuvieron por debajo de los correspondientes valores que habitualmente presenta la bibliografía [39]. Además, en este trabajo se vio que la velocidad de desplazamiento de los adultos mayores caedores fue menor que la velocidad de los adultos mayores no-caedores, pero se debe subrayar que esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Una de las interpretaciones que se ha hecho sobre la baja velocidad de desplazamiento durante la marcha es que ella puede representar un indicador de riesgo de sufrir caídas (al menos dentro de ciertos grupos de adultos mayores) [51]. Debido a que en este trabajo los valores de velocidad de ciclo de marcha encontrados para los distintos grupos de adultos mayores no mostraron diferencias la variable velocidad de marcha no permitió identificar a los sujetos caedores. Es posible que los valores de velocidad de ciclo de marcha menores a los de la bibliografía se deban a las condiciones experimentales en que se realizó el estudio, principalmente la longitud de la pasarela, ya que la baja velocidad de marcha también se ha asociado con situaciones en las que el sujeto tiene precaución más que con la pérdida de equilibrio en sí mismo [51, 53].

4.2 – Duración del ciclo de marcha.

La duración del ciclo de marcha de los adultos mayores no-caedores fue significativamente mayor a la presentada por adultos mayores caedores y jóvenes. El hecho de que los adultos mayores caedores presenten menor duración de ciclo de marcha e igual velocidad de progresión que los no-caedores conduce a determinar, de modo indirecto, que la longitud de cada paso es menor para el primer grupo mencionado. La disminución del largo de paso facilitaría el equilibrio [30] y quizás esté asociado con la ocurrencia previa de caídas. Dado que la frecuencia de ciclo de marcha es la inversa de su duración [12], el grupo de sujetos caedores mostró mayor frecuencia que el grupo de sujetos no-caedores. De esta forma la frecuencia de ciclo de marcha podría ser utilizada como variable para identificar a adultos mayores caedores.

4.3 – Variabilidad temporal del ciclo de marcha.

La menor variabilidad temporal de ciclo de marcha encontrada para el grupo de jóvenes respecto a los dos grupos de adultos mayores es consistente con lo presentado en la bibliografía [39, 53, 64]. Se ha visto que la duración del ciclo de marcha no se altera en forma importante en jóvenes adultos sanos [41, 42] y que esta variable puede ser considerada una medida cuantitativa que aumenta en síndromes asociados con las caídas [39, 65, 66, 67]. Sin

embargo, en este trabajo no se comprobó que los adultos mayores caedores tuvieran variabilidad temporal de ciclo de marcha mayor al grupo de adultos mayores no caedores. De todas maneras, esto último no debe ser tomado de modo concluyente ya que en el estudio fueron analizados pocos ciclos de marcha de cada individuo y esto constituye una limitante para la óptima medición de su variabilidad temporal [39].

4.4 – Equilibrio durante la marcha.

Los resultados de las comparaciones de EN entre los grupos de individuos fueron diferentes durante las fases de apoyo doble y el apoyo simple del ciclo de marcha. Durante el apoyo doble los valores promedios y máximos de EN permitieron discriminar entre el grupo de jóvenes y el grupo de adultos mayores caedores. En fase de apoyo simple el valor promedio de EN mostró diferencias entre el grupo de jóvenes y adultos mayores caedores, por su parte el valor mínimo presentó diferencias entre el grupo de adultos mayores caedores y los otros dos grupos de individuos analizados.

Los valores de EN encontrados a velocidad de marcha autoseleccionada indican que los adultos mayores caedores inician la fase de apoyo simple disponiendo su masa corporal de modo que el centro de masa total se proyecta cerca de la base de sustentación. Estos resultados estarían indicando la posibilidad de que los adultos mayores caedores utilicen una estrategia de marcha diferente a los otros grupos de individuos para minimizar su riesgo de sufrir una nueva caída. En este trabajo el valor mínimo de EN durante el apoyo simple fue el único elemento que claramente permitió discriminar al grupo de sujetos caedores de los demás grupos de individuos, este hecho postula a la variable EN como una variable que permitiría evaluar equilibrio en forma directa durante la marcha.

5 – Bibliografía.

- [1] Alexander RMcN, Fariña RA, Vizcaíno SF (1999). Tail blow energy and carapace fractures in a large glyptodont (Mammalia, Xenarthra). *Zoological Journal of the Linnean Society* 126:41-49.
- [2] Blanco RE, Gambini R, Fariña RA (2003). Mechanical model for theoretical determination of maximum running speed in mammals. *Journal of Theoretical Biology* 222:117-125.
- [3] Blanco RE, Gambini R (2006). A biomechanical model for size, speed and anatomical variations of the energetic costs of running mammals. *Journal of theoretical Biology* 241(1):49-61.
- [4] Linthorne NP (2001). Analysis of standing vertical jumps using a force platform. *Am. J. Phys.* 69(11):1198-1204.
- [5] Kuo C, Chang H, Chiang J (2007). Kinematics Analysis of Knee Joint Motion in Closed Chain Movement among Different Sports Events: A Pilot Study. *Journal of Biomechanics* 40:658-658.
- [6] Fábrega CG, Gómez M, Fariña RA (2008). Angle and speed in female handball penalty throwing: Effects of fatigue and player position. *International Journal of Performance Analysis in Sport* 8(1):56-67.
- [7] Stoquart GS, Detrembleur Ch, Palumbo S, Deltombe T, Lejeune TM (2008). Effect of Botulinum Toxin Injection in the Rectus Femoris on Stiff-Knee Gaitnext term in People With Stroke: A Prospective Observational Study. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 89(1):56-61.
- [8] Wonga MS, Chengb CY, Ngb BKW, Lamb TP, Sinc SW, Lee-Shumd LF, Chowa HK, Tam YP (2008). The effect of rigid versus flexible spinal orthosis on the gait pattern of patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Gait & Posture* 27:189-195.
- [9] Richardson JK, Thies S, Ashton-Miller A (2008). An exploration of step time variability on smooth and irregular surfaces in older persons with neuropathy. *Clinical Biomechanics* 23:349-356.
- [10] McCain JK, Pollo FE, Baum BS, Coleman SC, Baker S, Smith PS (2008). Locomotor Treadmill Training With Partial Body-Weight Support Before Overground Gaitnext term in Adults With Acute Stroke: A Pilot Study. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 89(4):684-691.

- [11] Goujon-Pillet H, Sapin E, Fodé P, Lavaste F (2008). Three-Dimensional Motions of Trunk and Pelvis During Transfemoral Amputee Gaitnext term. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 89(1):87-94.
- [12] Zatsiorsky VM (1998). Kinematics of Human Motion. *Human Kinetics*.
- [13] Veeger HEJ, Bing YU, Kai-Nan AN, Rozendal RH (1997). Parameters for Modeling the Upper Extremity. *J. Biomechanics* 6:647-652.
- [14] White AA, Manohar MP, Brand R (1975). A system for defining position and motion of the human body parts. *Medical and Biological Engineering and computing* 13(2):261-265.
- [15] Barros RML, Brezinkofer R, Leite NJ, Figueroa PJ (1999). Desenvolvimento e avaliação de um sistema para análise tridimensional de movimentos humanos. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica* 15(1-2):79-86.
- [16] Figueroa PJ, Leite NJ, Barros RML (2003). A flexible software for tracking of markers used in human motion analysis. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 72(2):155-165.
- [17] Baker SP, Harvey AH (1985). Fall injuries in the elderly. *Clin Geriatr Med* 1:501-12.
- [18] Mosenthal AC, Livingston DH, Elcavage J, Merritt S, Stucker S (1995). Falls: epidemiology and strategies for prevention. *J Trauma* 38:753-6.
- [19] Tinetti ME, Speechley M, Ginter SF (1998) Risk factors for falls among elderly persons living in the community. *N Engl J .Med* 319(26):1701-7.
- [20] Nevitt MC, Cummings SR, Kidd S, Black D (1989). Risk factors for recurrent nonsyncopal falls: A prospective study. *JAMA* 261(18):2663-8.
- [21] Prudham D, Evans JG (1981). Factors associated with falls in the elderly community. *Age Ageing* 10:141-6.
- [22] Blake AJ, Morgan K, Bendall MJ, Dallosso H, Ebrahim SB (1988). Falls by elderly people. *Age Ageing* 17:365-72.
- [23] Wickham C, Cooper C, Margetts BM, Barker DJP (1988). Muscle strength activity, housing and the risk of falls in elderly people. *Age Ageing* 18(1):47-51.
- [24] Rubenstein LZ, Robbins AS, Schulman BL, Rosado J, Osterweil D, Josephson KR (1988). Falls and instability in the elderly. *J Am Geriatr Soc* 36:266-78.
- [25] Perry BC (1982). Falls among the elderly living in high-rise apartments. *J Fam Pract* 14:1069-73.
- [26] Morse JM, Tylko SJ, Dixon HA (1987). Characteristics of the fall-prone patient. *Gerontologist* 27:516-22.
- [27] Myers AH, Baker SP, Van Natta MC, Abbey H, Robinson EG (1991) Risk factors associated with falls and injuries among elderly institutionalized persons. *Am J Epidemiol* 133:1179-90.
- [28] American Geriatrics S, British Geriatrics S, American Academy of Orthopaedic Surgeons panel on falls P (2001). Guideline for the Prevention of Falls in Older Persons. *J Am Geriatr Soc* 49:664-72.
- [29] Campbell AJ, Borrie MJ, Spears GF, Jackson SL, Brown JS, Fitzgerald JL (1990). Circumstances and consequences of falls experienced by a community population 70 years and over during a prospective study. *Age Ageing* 19(2):136-41.
- [30] Campbell AJ, Reinken J, Allan B, Martinez GS (1981). Falls in old age: a study of frequency and related clinical factors. *Age Ageing* 10:264-70.
- [31] Baker SP, Harvey AH (1985). Fall injuries in the elderly. *Clin Geriatr Med* 1:501-12.

- [32] Tinetti ME, Mendes de Leon CF, Doucette JT, Baker DI (1994). Fear of falling and fall-related efficacy in relationship to functioning among community-living elders. *J Gerontol* 49:140-7.
- [33] Tinetti ME, Williams CS (1997). Falls, injuries due to falls, and the risk of admission to a nursing home. *N Engl J Med* 337:1279-84.
- [34] Arfken CL, Lach HW, Birge SJ, Miller JP (1994). The prevalence and correlates of fear of falling in elderly persons living in the community. *Am J Public Health* 84:565-70.
- [35] Close JC, Lord SL, Menz HB, Sherrington C (2005). What is the role of falls? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 19(6):913-35.
- [36] Powell LE, Meyers AM (1995). The activities-Specific Balance Confidence (ABC) Scale. *J Geront A Biol Sci Med Sci* 50A(1):M28-34.
- [37] Cohen HS, Kimball KT, Adams AS (2000). Application of the vestibular disorders activities of daily living scale. *Laryngoscope* 110(7):1204-9.
- [38] Wolf SL, Barnhart HX, Kutner NG, Mc Neely E, Coogler C, Xu T (1996). Reducing frailty and falls in older persons: an investigation of Tai Chi and computerized balance training. Atlanta FICSIT Group. Frailty and Injuries: Cooperative studies of Intervention Techniques. *J Am Geriatr Soc* 44:489-97.
- [39] Hausdorff JM, Rios DA, Edelberg K (2001). Gait variability and fall risk in community-living older adults: A 1 year prospective study. *Arch Phys Med Rehabil* 82:1050-6.
- [40] Kangas M, Vikman I, Wiklander J, Lindgren P, Nyberg L, Jamsa T (2009). Sensitivity and specificity of fall detection in people aged 40 years and over. *Gait & Posture* 29:571-74.
- [41] Wall C, Wrisley DM, Statler KD (2009). Vibrotactile tilt feedback improves dynamic gait index: A fall risk indicator in older adults. *Gait & Posture* 30:16-21.
- [42] Berg KO, Wood-Dauphinee SL, Williams JL, Maki B (1992). Measuring balance in the elderly: validation of an instrument. *Can J Public Health* 83(Suppl 2):S7-11.
- [43] Oyer DS, Saxon D, Shah A (2007). Quantitative assessment of diabetic peripheral neuropathy with use of the clanging tuning fork test. *Endocr Pract* 13(1):5-10.
- [44] Rolke R, Magerl W, Campbell KA, Schalber C, Caspari S, Birklein F (2006). Quantitative sensory testing: a comprehensive protocol for clinical trials. *Eur J Pain (London England)* 10(1):77-78.
- [45] Nickens H (1985). Intrinsic factors in falling among the elderly. *Arch Intern Med* 145:1089-93.
- [46] Campbell AJ, Borrie MJ, Spears GF (1989). Risk factors for falls in a community-based prospective study of people 70 years and older. *J Gerontol* 44:M112-7.
- [47] Wolfson L, Whipple R, Amerman P, Tobin JN (1990). Gait assessment in the elderly: a gait abnormality rating scale and its relation to falls. *J Gerontol* 45:M12-19.
- [48] Tinetti ME (1986). Performance-oriented assessment of mobility problems in elderly patients. *J Amer Ger Soc* 34:119-26.
- [49] Helderscheit BC (2000). Movement variability as a clinical measure for locomotion. *J Appl Biomech* 16:419-27.

- [50] Dubost V, Kressing RW, Gonthier R, Herrmann FR, Aminian K, Najafi B (2006). Relationships between dual-task related changes in stride velocity and stride time variability in healthy older adults *Hum Movemen Sci* 25:372-82.
- [51] Hausdorff JM (2005). Gait variability: methods, modelling and meaning. *J Neuroeng Rehabil* 20(2):19-19.
- [52] Beauchet O, Allali G, Berrut G, Dubost V (2007). Is low lower-limb kinematic variability always an index of stability. *Gait & Posture* 26:327-328.
- [53] Maki BE (1997). Gait changes in older adults: predictions of falls or indicators of fear? *J Am geriatr Soc* 45:313-20.
- [54] Gardner MM, Buchner DM, Robertson MC, Campbell AJ (2001). Practical Implementation of an exercise based falls prevention programme. *Age and Ageing* 30:77-83.
- [55] Alexander RMcN (1982). *Locomotion of Animals*. Blackie, Glasgow.
- [56] Ting LH, Blickhan R, Full RJ (1994). Dynamic and static stability in hexapedal runners. *J exp Biol* 197(1):251-269.
- [57] Zollikofer CPE (1994). Stepping patterns in ants. I. Influence of speed and curvature. *J exp Biol* 192:95-106.
- [58] Alexander RMcN (2005). Walking Made Simple. *Science* 308:58-59.
- [59] Abdel-Aziz YI, Karara HM (1971). Direct Linear Transformation from comparator coordinates into object-space coordinates in close-range photogrammetry. *Proceedings of the Symposium on Close-Range Photogrammetry*. Falls Church, VA: American Society of Photogrammetry 1-18.
- [60] Meneghesso L (2002). Análise de marcha: protocolo experimental a partir de variáveis cinemáticas e antropométricas. Tesis de Mestre em Biodinâmica do Movimento Humano, Faculdade de Educação Física, Universidade Estadual de Campinas.
- [61] Pavol MJ, Owings TM, Grabiner MD (2002). Body segment inertial parameter estimation for the general population of elder adults. *Journal of Biomechanics* 35:707-712
- [62] Jensen RK, Fletcher P (1994). Distribution of mass to the segments of elderly males and females. *Journal of Biomechanics* 27:89-96.
- [63] Dempster WT, Gaughran GRL (1967). Properties of body segments based on size and weight. *American Journal of Anatomy* 120:33-54.
- [64] Guimaraes RM, Isaacs B (1980). Characteristics of the gait in old people who fall. *Int Rehabil Med* 2:177-180.
- [65] Schaafsma JD, Giladi N, Balash Y, Bartels AL, Gurevich T, Hausdorff JM (2003). Gait dynamics in Parkinson's disease: relationship to Parkinsonian features, falls and response to levodopa. *J. Neurol. Sci.* 212:47-53.
- [66] Sheridan PL, Solomont J, Kowall N, Hausdorff JM (2003). Influence of executive function on locomotor function: divided attention increases gait variability in Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* 51:1633-1637.
- [67] Hausdorff JM, Edelberg HK, Mitchell SL, Goldberg AL, Wei JY (1997). Increased gait unsteadiness in community-dwelling elderly fallers. *Arch phys Med Rehabil* 78:278-283.

II - ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA MUSCULAR MÁXIMA RELATIVA Y LA POTENCIA MECÁNICA MÁXIMA EN DOS TIPOS DE SALTOS VERTICALES EN ATLETAS

1 - Introducción.

1.1 - Los análisis dinamométricos en biomecánica.

El movimiento del cuerpo humano en el espacio se produce bajo la acción de fuerzas externas, las que éste le imprime al medio y con las que el medio le corresponde. Además, el comportamiento de estas fuerzas en el tiempo es característico de cada movimiento y las condiciones en las cuales ellos se ejecutan. La cuantificación y relación de las fuerzas con el efecto que producen es uno de los objetivos principales de los estudios dinámicos en biomecánica.

Las fuerzas externas que actúan sobre el cuerpo humano (o las generadas por él) pueden ser registradas en forma directa mediante el uso de dinamómetros. Estos básicamente son instrumentos que censan la fuerza ejercida según el grado de deformación que sufren ciertos componentes que forman parte de su estructura. Un ejemplo de dinamómetro es la plataforma de fuerzas, su uso es muy extendido tanto en estudios del área básica [1, 2, 3] como aplicados al deporte [4] y la salud [5]. Comúnmente la plataforma de fuerza se coloca a nivel del piso y encima de ella el individuo efectúa su movimiento, el resultado final es un registro instante a instante de la magnitud de las componentes de la fuerza de reacción del suelo.

1.2 - Los análisis electromiográficos en biomecánica.

Para una completa comprensión del movimiento se requiere conocer el grado de participación de distintos grupos musculares. Una de las formas de estimar la participación muscular es a través del registro de su actividad eléctrica utilizando la técnica conocida como electromiografía.

La señal electromiográfica corresponde a la suma algebraica de todas las señales eléctricas detectadas en cierta área, estando sujeta a cambios a nivel de las propiedades musculares así como del control del sistema nervioso [6]. Estos registros pueden ser obtenidos por la inserción de agujas a nivel muscular o por la ubicación de electrodos en la superficie del cuerpo que se conectan con el aparato conocido como electromiógrafo.

La electromiografía ha permitido evaluar la coordinación entre grupos musculares en determinados gestos motores [7], valorar el estado neurológico de los individuos [8], estimar cambios de la actividad eléctrica muscular en distintas condiciones, como fatiga [9] y lesión [10] entre otros.

1.3 - El problema estudiado y su importancia.

Las pruebas de saltos verticales constituyen una forma bastante difundida de evaluar la potencia y distintas manifestaciones de la fuerza en miembros inferiores [11, 12, 13]. Se ha visto mediante estudios cinemáticos y electromiográficos que la secuencia temporal de activación muscular así como la amplitud de los movimientos articulares durante saltos verticales son comparables entre diferentes sujetos [14].

El mejor desempeño en saltos verticales que implican ciclos de estiramiento-acortamiento (SSC) de las unidades músculo-tendinosas participantes se ha asociado, entre otras cosas, con control de las propiedades mecánicas del músculo por parte del sistema nervioso [15]. Por otra parte, si bien mediante simulaciones se ha demostrado la importancia de las adaptaciones del sistema nervioso durante una serie de saltos repetidos (en los que el individuo busca mantener el rendimiento) [16], hasta ahora los resultados experimentales de las medidas de la actividad eléctrica sugieren que existe un patrón rígido de control para los saltos verticales con SSC [14]. No obstante, estos resultados han sido muy discutidos ya que en otras actividades que implican SSC, como el andar en bicicleta o en la carrera, la reorganización del patrón de activación ha sido claramente demostrada [8]. Es así que aparece la posibilidad de que en nuevos estudios se puedan determinar cambios en la actividad eléctrica asociados a cambios de estrategias durante una serie de saltos verticales.

La potencia mecánica suministrada a un cuerpo se puede expresar como el producto escalar de la fuerza que actúa sobre él y la velocidad que adquiere. Así es que la fuerza vertical y la velocidad vertical son elementos cruciales en el resultado de los saltos verticales [17]. Conocer cómo estas variables cambian en diferentes situaciones y cómo se

relacionan con la actividad muscular puede representar un aporte sustancial aplicado a la clínica y el deporte, pero también en el área básica, ya que el tema se enmarca dentro del conocimiento general de la mecánica muscular.

En este contexto es que en el año 2008 fue aprobado el proyecto de Doctorado (PEDECIBA) de MsC. Gabriel Fábrica, “Efecto de la fatiga neuromuscular sobre la actividad eléctrica en músculos de miembro inferior durante saltos con ciclo estiramiento-acortamiento: estudio en deportistas con diferente porcentaje de fibras en extensores de piernas”. A grandes rasgos este proyecto evaluó los posibles cambios en la actividad eléctrica de músculos de miembro inferior por causa de la fatiga neuromuscular durante actividades SSC, tomando en cuenta la composición relativa de los distintos tipos de fibras musculares.

En el marco de este proyecto se realizaron parte de las actividades de pasantía que aquí se presentan. El objetivo general fue determinar si existe correlación entre la actividad eléctrica máxima de seis músculos de miembro inferior con el nivel de potencia mecánica máxima durante la fase de impulso de saltos verticales con SSC y sin SSC en condiciones normales (sin fatiga), con fatiga inmediata y 24 horas después de la actividad que condujo a la fatiga. Para ello se debió determinar el valor máximo de actividad eléctrica de los músculos (sóleo, gastrocnemio medial, tibial anterior, vasto lateral, recto anterior y bíceps femoral) y el valor máximo de la potencia mecánica durante la fase de impulso de los saltos. Por último, analizar la relación entre el nivel máximo de potencia mecánica y la actividad eléctrica máxima de cada músculo durante la fase de impulso de los saltos.

2 - Materiales y métodos.

2.1 - Característica de la muestra

La población de estudio se compuso de 2 atletas (corredores de fondo) de sexo masculino de 19 y 20 años de edad, masa promedio 65 kg y altura promedio 1,75 m.

Ellos fueron informados de los objetivos y procedimientos del estudio y se les presentó un consentimiento informado que fue previamente aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República, Uruguay.

2.2 - Preparación de los individuos

Los individuos fueron preparados para la colecta de datos electromiográficos. A los efectos de minimizar la impedancia piel-electrodo [18, 19] se depilaron y limpiaron con alcohol las zonas de registros establecidas por las SENIAM (*Surface ElectroMyography for the Non-invasive assesment of Muscles*) para los músculos: sóleo, gastrocnemio medial, tibial anterior, vasto lateral, recto anterior y bíceps femoral. Se utilizaron electrodos de superficie de Ag-AgCl (configuración bipolar) con una distancia de centro a centro de 2 cm [19, 20].

Los electrodos fueron ubicados en las siguientes posiciones:

- *sóleo*: a 2/3 de la línea que une el cóndilo medial del fémur y el maléolo medial mientras el individuo se encuentra sentado con la rodilla flexionada aproximadamente 90° y el pie del miembro investigado en el piso.
- *gastrocnemio medial*: sobre la zona más prominente del músculo mientras el individuo se encuentra acostado boca abajo con la rodilla extendida y el pie en extensión plantar.
- *tibial anterior*: a 1/3 de la línea comprendida entre la punta de la tuberosidad tibial y el maléolo medial mientras el individuo se encuentra sentado.
- *vasto lateral*: a 2/3 de la línea entre la espina iliaca antero-superior y la cara lateral de la rótula mientras el individuo se encuentra sentado en una mesa con la rodilla en ligera flexión y la parte superior del cuerpo ligeramente inclinada hacia atrás.
- *recto anterior*: a un 1/2 de la línea que va de la espina iliaca antero-superior a la parte superior de la rótula, mientras el individuo se encuentra sentado en la mesa con la rodilla en ligera flexión y la parte superior del cuerpo ligeramente inclinada hacia atrás.
- *bíceps femoral*: a un 1/2 de la línea que une la tuberosidad isquial y el epicóndilo lateral de la tibia mientras el sujeto se encuentra acostado boca abajo con el muslo sobre la mesa y en ligera rotación lateral, las rodillas flexionadas 90° y la pierna con ligera rotación lateral respecto al muslo.

2.3 - Preparación del equipamiento.

Se verificó el funcionamiento de los canales del electromiógrafo Miotool 400 conectando los extremos de los cables con los electrodos de registros y solicitándole al individuo que realizara pequeñas contracciones de los músculos a

estudiar. Luego se ajustaron los cables adhiriendo los mismos a la piel con cinta y colocando por encima una media de nylon.

Se probó el funcionamiento de la plataforma de fuerza y se ajustó su sensibilidad a los efectos de evitar la saturación de la señal durante la caída en los saltos (momento en el cual se registran valores de fuerza vertical que superan aproximadamente en 3 veces al peso corporal).

2.4 - Generalidades de los procedimientos experimentales.

2.4.1 - Contracciones voluntarias máximas.

A los efectos de cuantificar la actividad eléctrica máxima se hicieron registros electromiográficos de las contracciones voluntarias máximas de los músculos. Para ello cada individuo realizó las siguientes contracciones isométricas en banco: extensión de rodilla (vasto lateral y recto anterior), flexión de rodilla (bíceps femoral), flexión dorsal de pie (tibial anterior) y extensión plantar (gastrocnemio medial y sóleo).

2.4.2 - Saltos verticales.

Cada individuo realizó tres series de saltos verticales en distintas condiciones. La primera serie se realizó en condiciones normales (condición 1), la segunda serie se realizó luego de un protocolo de fatiga (condición 2) y la tercera serie se realizó 24 horas después de realizado el protocolo de fatiga (condición 3).

Los saltos realizados fueron de tipo *Squat Jump* (SJ) y *Counter Movement Jump* (CMJ) [12, 13]. En el SJ el individuo parte de una posición con rodillas y cadera flexionada 90 grados y las manos en la cintura (Figura 1 a). En el CMJ el individuo parte de la posición de parado con manos en la cintura, flexiona sus rodillas y cadera hasta un ángulo de 90 grados (situación de inicio del SJ) y en una segunda fase se impulsa hacia arriba (Figura 1 b).

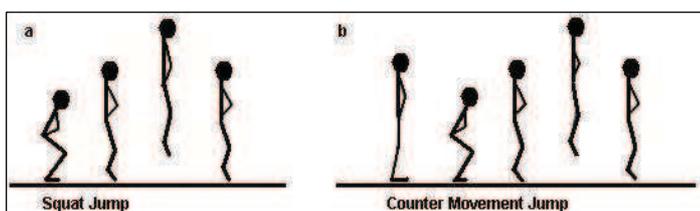


Figura 1 – Se muestran esquemáticamente los movimientos realizados durante los dos tipos de saltos analizados: a) Salto de tipo *Squat Jump* b) Salto de tipo *Counter Movement Jump*.

En cada serie de saltos (condiciones 1, 2 y 3) se intercaló un salto de tipo SJ con otro de tipo CMJ existiendo una breve pausa entre cada uno. El mínimo de saltos realizados (de cada tipo) fue de 6. La fatiga se obtuvo por la ejecución de saltos verticales continuos durante un minuto.

Durante la ejecución de los saltos se registraron en forma simultánea datos de plataforma de fuerza y electromiografía, a fin de obtener la componente vertical de la fuerza de reacción del piso y la actividad eléctrica de los músculos participantes.

2.5 - Adquisición y procesamiento de los datos de plataforma de fuerza.

Se registró la componente vertical de la fuerza de reacción del piso en función del tiempo utilizando una plataforma AMTI modelo OR6-5 (*Advanced Mechanical Technology Inc.*, Watertown, Massachusetts).

El archivo bruto de fuerza se trató con el programa SAD (*Laboratório de Medições Mecânicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*) a fin de separar las señales correspondientes a las 3 componentes de las fuerzas de reacción del piso (F_x , F_y y F_z) y sincronismo. Posteriormente las señales de las componentes de fuerza de reacción del piso fueron procesadas en el programa MatLab® (*Mathworks, Inc.*) para transformar sus unidades de miliVolt a Newton.

El archivo obtenido fue tratado nuevamente en el programa SAD. En el mismo se calculó y trazó la fuerza peso del individuo y en la curva de fuerza vertical se identificaron y separaron los saltos realizados por el individuo. Posteriormente se crearon archivos individuales con los valores de fuerza vertical durante cada salto.

Estos archivos de fuerza vertical fueron cargados en el programa MatLab y utilizando una rutina específica creada en este programa se identificó la fase de impulso en cada salto y se calculó la potencia mecánica máxima alcanzada en cada una de ellas.

2.6 - Adquisición y procesamiento de datos electromiográficos.

Durante la captura de los datos electromiográficos se utilizó una frecuencia de muestreo de 1000 Hz. Se escogió esta frecuencia de muestro de modo que fuera mayor al doble de la máxima frecuencia de la señal capturada (en electromiografía de superficie este valor máximo es cercano a 400 Hz) y así lograr una correcta reconstrucción digital.

El procesamiento de los archivos electromiográficos fue realizado en el programa SAD. Se efectuó el filtrado de las señales utilizando un filtro “Ideal” con frecuencia de corte mínima de 20 Hz y máxima de 1000 Hz. Estas frecuencias fueron determinadas realizando un análisis visual de la señal en el dominio de la frecuencia [18].

2.6.1 - Procesamiento de la señal electromiográfica durante contracción voluntaria máxima.

La señal electromiográfica correspondiente a la contracción voluntaria máxima de cada músculo fue analizada en el dominio del tiempo a los efectos de determinar la amplitud de la señal. Para ello se recurrió al cálculo del *Root Mean Square* (RMS) [19].

$$RMS = \sqrt{\frac{x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_n^2}{n}}$$

Donde x_1, x_2 a x_n , representan los valores medios de actividad eléctrica durante un determinado período de tiempo o ventana temporal y n total de valores medios. La ventana típica para el cálculo de RMS está entre 0,100 s a 0,200 s [20], en este trabajo se utilizó una ventana de 0,2 s. Finalmente se determinó el valor máximo de la señal de RMS para cada músculo.

2.6.2 - Procesamiento de la señal electromiográfica durante el impulso.

En el programa SAD se realizó la sincronización temporal de las señales electromiográficas con los registros de fuerza vertical haciendo coincidir las señales de sincronismo de cada tipo de archivo.

Observando los registros de fuerza vertical y peso se identificó el tiempo inicial y tiempo final de la fase de impulso de cada salto. Al tiempo inicial identificado se le restó 0,12 segundos correspondiente al *delay* entre el inicio real de la actividad eléctrica muscular y la aparición de la señal en el registro de fuerza.

Posteriormente se calculó el RMS de la señal electromiográfica de cada músculo (de la misma manera que fue explicado para las contracciones voluntarias máximas).

Las curvas de RMS de cada músculo fueron analizadas durante las fases de impulso de cada salto, es decir entre el inicio real de la actividad eléctrica muscular que precede al impulso y el fin del impulso propiamente dicho. En ese intervalo de tiempo se determinaron los valores de RMS máximo.

2.6.3 - Obtención de RMS máximo relativo.

Para obtener los valores de RMS máximo relativo se realizó el cociente entre el valor de RMS máximo de cada músculo durante la fase de impulso de cada salto y el RMS máximo del músculo obtenido durante su contracción voluntaria máxima.

$$RMS \text{ máximo relativo} = \frac{RMS_{\text{máximo impulso}}}{RMS_{\text{máximo CVM}}}$$

2.7 - Análisis estadístico.

Los procedimientos estadísticos fueron realizados en el programa SPSS (versión 12.01). Se efectuaron cálculos de estadística descriptiva para determinar las características generales de las actividades eléctricas máximas relativas de los

seis músculos analizados y de la potencia mecánica máxima alcanzada durante la fase de impulso de los distintos tipos de saltos en las distintas condiciones.

Se comparó la potencia mecánica máxima alcanzada durante la fase de impulso de los SJ y CMJ en las 3 condiciones consideradas a través de test-t de muestras independientes suponiendo varianzas desiguales.

Se comparó la potencia mecánica máxima alcanzada durante la fase de impulso de los saltos SJ en las 3 condiciones consideradas a través de ANOVA y test post-hoc de Bonferroni. De la misma forma se analizó la potencia mecánica máxima alcanzada durante la fase de impulso de los saltos CMJ en las 3 condiciones. En todos los casos fue $\alpha=0,05$.

Se evaluó la existencia de correlación entre la actividad eléctrica máxima relativa de cada músculo y la potencia mecánica máxima alcanzada en las tres condiciones para los saltos SJ y CMJ. En los casos que la distribución de los datos de la muestra fue normal (test Shapiro-Wilk, $\alpha=0,05$) se hizo correlación lineal de Pearson ($\alpha = 0,05$), mientras que en los casos donde la distribución de los datos no era normal se realizó correlación lineal de Spearman ($\alpha=0,05$).

3 - Resultados.

3.1 - Valores de actividad eléctrica máxima relativa.

Los valores de actividad eléctrica máxima relativa de los músculos estudiados durante la fase de impulso de los saltos de tipo SJ y CMJ (en las tres condiciones experimentales) se resume en las tablas 1 y 2 respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre los RMS máximo relativo de cada músculo en las distintas condiciones durante cada tipo de salto.

Músculo	Condición 1 (n=9)	Condición 2 (n=14)	Condición 3 (n=12)
B	0,379 ± 0,141	0,356 ± 0,209	0,492 ± 0,181
R	0,629 ± 0,127	0,605 ± 0,207	0,557 ± 0,093
V	0,252 ± 0,103	0,286 ± 0,083	0,247 ± 0,080
G	0,051 ± 0,015	0,085 ± 0,051	0,069 ± 0,039
S	0,134 ± 0,040	0,174 ± 0,080	0,146 ± 0,066
T	0,259 ± 0,067	0,356 ± 0,098	0,236 ± 0,105

Tabla 1 – Valores de RMS máximo relativo (media y desvío estándar) alcanzados durante la fase de impulso de los salto tipo SJ en las 3 condiciones de experimentación para los músculos: bíceps femoral (B), recto anterior (R), vasto lateral (V), gastrocnemio medial (G), sóleo (S) y tibial anterior (T).

Músculo	Condición 1 (n=18)	Condición 2 (n=12)	Condición 3 (n=14)
B	0,424 ± 0,204	0,359 ± 0,214	0,445 ± 0,202
R	0,695 ± 0,168	0,658 ± 0,129	0,598 ± 0,156
V	0,177 ± 0,079	0,244 ± 0,045	0,250 ± 0,072
G	0,097 ± 0,059	0,119 ± 0,083	0,100 ± 0,060
S	0,208 ± 0,058	0,232 ± 0,063	0,174 ± 0,040
T	0,140 ± 0,096	0,227 ± 0,163	0,202 ± 0,164

Tabla 2 – Valores de RMS máximo relativo (media y desvío estándar) alcanzados durante la fase de impulso de los salto tipo CMJ en las 3 condiciones de experimentación para los músculos: bíceps femoral (B), recto anterior (R), vasto lateral (V), gastrocnemio medial (G), sóleo (S) y tibial anterior (T).

3.2 - Valores de potencia mecánica máxima

Los valores de potencia mecánica máxima alcanzados durante la fase de impulso de los saltos en las 3 condiciones experimentales se presentan en la tabla 3. Además se observó que la potencia mecánica máxima fue significativamente mayor durante los saltos con SSC (CMJ) en las tres condiciones (normal, fatiga inmediata y 24 horas después del protocolo de fatiga).

	Potencia mecánica máxima (W)	
	SJ	CMJ
Condición 1	3570,56 ± 459,78	4355,00 ± 376,66*
Condición 2	3457,25 ± 220,08	5017,38 ± 506,64*
Condición 3	3302,76 ± 228,77	4569,66 ± 335,76*

Tabla 3 - Valores de potencia mecánica máxima (media y desvío estándar) alcanzados durante la fase de impulso de los saltos SJ y CMJ en cada condición de experimentación. Se señala con asteriscos (*) los casos en que los valores mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) durante una misma condición.

A través de ANOVA se compararon las potencias mecánicas máximas alcanzadas durante la fase de impulso de los saltos SJ en las distintas condiciones sin encontrarse diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$). De la misma forma se compararon las potencias mecánicas máximas durante la fase impulso de los saltos de tipo CMJ en las distintas condiciones encontrándose diferencias significativas entre ellas ($p \leq 0,05$). El test de Bonferroni mostró que la potencia mecánica máxima en los saltos CMJ alcanzada durante la condición 2 difirió de las alcanzadas en la condición 1 y 3 (que fueron iguales).

3.3 - Correlación entre potencia mecánica máxima y actividad eléctrica máxima relativa de cada músculo.

Las tablas 4 y 5 presentan los resultados de las correlaciones entre actividad máxima de los músculos y la potencia mecánica máxima durante la fase de impulso de los saltos SJ y CMJ respectivamente. En cada caso se discriminan las correlaciones por condición.

		B	R	V	G	S	T
Condición 1 (n=9)	r	-0,775*	0,709*	-0,743*	-0,117	0,122	0,341
	Sig.	0,014	0,033	0,022	0,765	0,754	0,369
Condición 2 (n=14)	r	-0,526	0,163	-0,407	0,026	0,058	-0,336
	Sig.	0,053	0,578	0,148	0,930	0,845	0,240
Condición 3 (n=12)	r	-0,167	0,199	-0,557	0,247	0,580	-0,191
	Sig.	0,603	0,536	0,060	0,440	0,148	0,551

Tabla 4 - Resultados de la correlación entre la potencia mecánica máxima durante la fase de impulso los saltos de tipo SJ y los correspondientes RMS máximos relativo de los músculos bíceps femoral (B), recto anterior (R), vasto lateral (V), gastrocnemio medial (G), sóleo (S) y tibial anterior (T). Los asteriscos (*) señalan las situaciones en que existió correlación entre la actividad eléctrica del músculo y la potencia alcanzada.

		B	R	V	G	S	T
Condición 1 (n=18)	r	-0,744*	0,686*	-0,192	-0,569*	-0,278	0,225
	Sig.	0,000	0,002	0,446	0,014	0,265	0,370
Condición 2 (n=12)	r	-0,411	0,418	-0,222	-0,459	-0,371	0,585
	Sig.	0,184	0,176	0,488	0,133	0,236	0,146
Condición 3 (n=13)	r	-0,332	0,600	-0,616	-0,266	-0,033	0,294
	Sig.	0,267	0,430	0,125	0,380	0,915	0,329

Tabla 5 - Resultados de la correlación entre la potencia mecánica máxima durante la fase de impulso de los saltos de tipo CMJ y los correspondientes RMS máximo relativo de los músculos bíceps femoral (B), recto anterior (R), vasto lateral (V), gastrocnemio medial (G), sóleo (S) y tibial anterior (T). Los asteriscos (*) señalan las situaciones en que existió correlación entre la actividad eléctrica del músculo y la potencia alcanzada.

4 - Discusión.

4.1 – Actividad eléctrica máxima relativa.

Los valores de actividad eléctrica máxima relativa de los seis músculos considerados (estudiados mediante RMS máximo relativo) estuvieron dentro del rango de valores que presenta la bibliografía [14, 21, 22]. Además, se observó que estos valores se mantenían constantes en cada condición. Dado que los valores de RMS dependen de la superficie muscular activa, su variación puede estar determinada por el número de fibras en actividad, el tamaño de las fibras en actividad o ambos.

En términos generales durante los movimientos explosivos (como los saltos verticales), las fibras musculares que tienden a ser reclutadas en primera instancia son rápidas y fatigables [23]. Esta fibra es la de menor tamaño en comparación a los otros tipos de fibras y, como sucede para todas, su número varía en los distintos tipos de músculos. Para los músculos analizados de los atletas que formaron parte del estudio se puede suponer que el número de fibras rápidas no predomina ante el número de fibras lentas e intermedias [17].

La constancia en los valores de RMS máximo relativo de cada músculo estaría indicando que distinta cantidad de fibras de diferentes tamaños se activarían en las distintas condiciones para lograr el mismo pico de actividad eléctrica. Es posible que el pico de actividad eléctrica logrado en la condición 1 con la participación de un importante número de fibras musculares rápidas fatigables sea equiparado en la condición 2 por un aumento del

número de fibras lentas e intermedias en actividad. Mientras que en la condición 3 se alcanzaría el pico de actividad eléctrica con la participación predominante de uno u otro tipo de fibra según el grado de recuperación de ATP [17].

Un aspecto importante a analizar en futuros trabajos es la secuencia temporal de los valores de RMS máximos relativos. Este análisis podría reflejar cambios de estrategia en la activación muscular en distintas condiciones de fatiga. Si esto último sucediera constituiría evidencia en favor de las propuestas que sugieren que no existe un patrón rígido de activación para saltos verticales, hecho que no pudo ser discutido con los resultados obtenidos aquí.

4.2 – Potencia mecánica máxima.

En la comparación de la potencia mecánica máxima considerando como factor el tipo de salto se observaron mayores valores de potencia en actividades que implican ciclo acortamiento-estiramiento (saltos del tipo CMJ). Esto concuerda con los resultados de trabajos que muestran que el pico de fuerza de reacción del piso alcanzado durante la fase de impulso y relativizado por el peso corporal presenta diferencias entre los saltos de tipo CMJ y SJ [26]. Todo esto lleva a pensar que la fuerza de despegue durante movimientos explosivos aumenta cuando los principales músculos implicados en el salto son estirados antes de que se acorten.

En términos generales el mayor pico de potencia durante el impulso de los saltos de tipo CMJ respecto al SJ se puede asociar con aspectos históricos dependientes de la producción de fuerza muscular [23]. En este sentido los resultados estarían indicando que el pre-estiramiento de los elementos pasivos que son parte de las unidades músculo-tendinosas de los extensores de rodilla y tobillo favorecerían la capacidad de generar fuerza activa en la segunda parte del impulso durante los saltos de tipo CMJ. Este aumento de la capacidad de fuerza puede ser asociado con diferentes mecanismos [15, 21].

Por otra parte, la no existencia de diferencias significativas entre las potencias mecánicas máximas alcanzadas durante los saltos de tipo SJ en las distintas condiciones es un resultado de difícil interpretación. En futuros estudios se debería tomar en cuenta el momento en que ocurre el pico de potencia mecánica máxima, ya que es posible que la fatiga determine diferencias en los instantes en que ocurren durante el impulso. Si el valor máximo de potencia mecánica se alcanza en distintos momentos antes del despegue podría ocurrir disminución de la performance a medida que se suceden los saltos. Los mayores valores de potencia mecánica máxima alcanzados en la condición 2 durante la fase de impulso de los saltos de tipo CMJ conducen también a considerar la importancia de los instantes de potencia mecánica máxima. Esto se apoya en que durante la condición 2 está establecido que las capacidades de generar fuerza de modo activo se hallan disminuidas [17].

4.3 – Correlaciones entre actividad eléctrica máxima relativa y potencia mecánica máxima.

Los resultados de las correlaciones entre actividad eléctrica máxima relativa y potencia mecánica máxima mostraron que son significativas en la condición 1 para los músculos bíceps femoral (correlación negativa) y recto anterior (correlación positiva) tanto en los saltos de tipo SJ como CMJ. También en la condición 1 se observó correlación significativa del pico de RMS del vasto lateral y la potencia mecánica máxima en los saltos de tipo SJ (correlación negativa) y el pico de RMS del gastrocnemio medial y el pico de potencia mecánica en los saltos CMJ (correlación negativa). Estos resultados no son coherentes con las observaciones que indican que los músculos extensores de rodilla tienen gran importancia como generadores de fuerza en el resultado de saltos verticales en condiciones normales [27, 28]. Una posible explicación es que el estudio que aquí se presenta fue realizado tomando en cuenta los valores máximos de actividad eléctrica muscular y potencia mecánica. Estudios similares a éste [14] consideran la actividad eléctrica total (integral de la curva) durante la fase de impulso, pero se debe tener en cuenta que distintos comportamientos temporales de la actividad eléctrica muscular pueden dar lugar a un mismo valor de actividad eléctrica total.

Los futuros trabajos que analicen la relación entre potencia mecánica y actividad eléctrica muscular deberían considerar las variables actividad eléctrica total, picos de actividad eléctrica, instantes en que ocurren estos picos y la potencia mecánica. Es posible que este nuevo abordaje posibilite la identificación, si es que existe, de distintas estrategias que permitan mantener la performance en condición de fatiga.

5 – Bibliografía.

[1] Cavagna GA, Kaneko M (1977). Mechanical work and efficiency in level walking and running J. Physiol. 268:467-481.

- [2] Cavagna GA, Mantovani M, Willems PA, Musch G (1997). The resonant step frequency in human running. *Eur J Physiol* 434:678–684.
- [3] Saibene F, Minetti AE (2003). Biomechanical and physiological aspects of legged locomotion in humans. *Eur J Appl Physiol* 88:297-316.
- [4] Hara M, Shibayama A, Takeshita D, Fukashiro S (2006). The effect of arm swing on lower extremities in vertical jumping. *Journal of Biomechanics* 39:2503-2511.
- [5] Sutherland DH. (2005). The evolution of clinical gait analysis part III-Kinetics and energy assessment. *Gait & Posture* 21(4) 447-461.
- [6] Enoka RM (2000). *Bases neuromecânicas da cinesiologia*. São Paulo: Manole.
- [7] Pincivero DM, Gandhi V, Timmons MK, Coelho AJ (2006). Quadriceps femoris electromyogram during concentric, isometric and eccentric phases of fatiguing dynamic knee extensions. *Journal of Biomechanics* 39:246-254.
- [8] Van Ingen Schenau GJ, Van Soest AJ, Gabreels FJM, Horstink MW (1995). The control of multi-joint movements relies on detailed internal representations. *Hum. Movement Sci.* 14:531-538.
- [9] Orizio C (2000). Muscle Fatigue Monitored by Force, Surface Mechanomyogram, and EMG: In *Biomechanics and Biology of Movements* (Edited by B. M. Nigg, B. R. Mac Intosh and J. Mester) Champaign IL, Human Kinetics.
- [10] Suter E, Herzog W, De Souza K, Bray R (1998). Inhibition of the quadriceps muscles in patients with anterior knee pain. *J Appl Biomechanics* 14:360-373.
- [11] Raven PB, Gettman LR, Pollock ML, Cooper KH (1976). A physiological evaluation of professional soccer players. *Br. J. Sports Med.* 10:209-216.
- [12] Bosco C (1990). *Aspetti fisiologici della preparazione fisica del calciatore*. Roma: Società Stampa Sportiva.
- [13] Bosco C (1994). *La valoración de la fuerza con el test de Bosco*. Barcelona: Editorial Paidotribo.
- [14] Rodacki AL, Fowler NE, Bennett SJ (2002). Vertical jump coordination: fatigue effects. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 34(1):105-116.
- [15] Bobbert MF, Gerritsen KG, Litgens MCA, Van Soest AJ (1996). Why is countermovement jump height greater than squat jump height? *Med. Sci. Sports Exerc.* 28(11):1402-1412.
- [16] Bobbert MF, Van Soest AJ (1994). Effects of muscle strengthening on vertical jump height: a simulation study. *Med. Sci. Sports Exerc.* 26:1012-1020.
- [17] Wilmore JH, Costill DL (2006). *Fisiología del esfuerzo y del deporte*. Ed. Paidotribo, Barcelona.
- [18] Winter DA (1990). *Biomechanics and motor control of human movement* 2^a ed. Toronto: Wiley Interscience.
- [19] Hermens MJ, Freriks B (2000). Development of recommendations for EMG sensors and sensor placement procedures. *J. Electromyogr. Kinesiol* 10(5):361-364.
- [20] De Luca CJ (1997). The use of surface electromyography in biomechanics. *Journal of Applied Biomechanics* 13:135-163.
- [21] Bobbert MF, Van Ingen Schenau GJ (1988). Co-ordination in vertical jumping. *J. Biomech.* 21:249-262.

- [22] Viitasalo JT, Salo A, Lahtinen J (1988). Neuromuscular functioning of athletes and non-athletes in the drop jump. *Eur. J. Appl. Physiol.* 78:432-440.
- [23] Herzog W (2000). Cellular and Molecular Muscle Mechanics. In: *Skeletal Muscle Mechanics: From Mechanisms to Function* (edited by W Herzog), John Wiley & Sons, Ltd..
- [26] Kubo K, Kawakami Y, Fukunaga T (1999). The influence of elastic properties of tendon structures on jump performance in humans. *Journal of Applied Physiology* 87:2090-2096.
- [27] Kellis E, Baltzopoulos V (1997). The effects of antagonist moment on the resultant knee joint moment during isokinetic testing of the knee extensors. *Eur. J. Appl. Physiol.* 76:253-259.
- [28] Psek JA, Cafarelli E (1993). Behaviour of coactive muscles during fatigue. *J. Appl. Physiol.* 74:170-175.

Papel de las conductancias de potasio en la homeostasis dendrítica y su posible papel en la patología Humana.

Licenciatura en Biología Humana, Diego Lombardo.

Resumen: El objetivo general del trabajo realizado en la pasantía consistió en el estudio del papel de algunas conductancias de potasio en el control de la retropropagación del potencial de acción en neuronas piramidales de CA1 de hipocampo, en una preparación in Vitro. Este estudio utilizó la técnica de registro extracelular de potenciales de campo y el análisis de la densidad de fuentes de corriente (current source density analysis, CSDA) a los efectos de estimar las corrientes transmembrana responsables de las señales extracelulares. En el camino formativo hacia el manejo de estas técnicas, se planteó como primer objetivo específico el estudio extracelular de las corrientes de acción a través de la medición del potencial de campo en un conductor de volumen, desarrollado por el potencial de acción compuesto del nervio aislado en ciático de rana, basándonos en el estudio de clásico y referente de R Lorente de No (1947). En una segunda etapa, el objetivo específico consistió en realizar una caracterización primaria de la conducción dendrítica de los PAs antidrómicos (retropropagación, rp) en neuronas piramidales de hipocampo de CA1 y analizar las modificaciones provocadas por el bloqueo de dos conductancias de potasio: I_{ahp} e I_A . Hemos obtenido evidencias en favor del control de la rp-PAs ejercido por estas conductancias. Se discute la interacción entre I_{ahp} e I_A en la regulación de la excitabilidad dendrítica particularmente en su influencia en la generación de brotes de descarga característicos. En esta región del SNC, en condiciones fisiológicas, el desarrollo de brotes de potenciales de acción involucra la participación de las propiedades activas de las dendritas. La respuesta en brotes exagerada y espontánea, constituye un fenotipo electrofisiológico patológico, característico de la actividad epileptiforme.

Introducción

En el desarrollo de la neurociencia moderna, el árbol dendrítico fue inicialmente concebido como un compartimiento neuronal capaz de integrar de forma pasiva y lineal las entradas sinápticas que recibe la neurona. De acuerdo a este modelo, el proceso de integración neuronal contempla críticamente las características geométricas del árbol dendrítico y resulta fundamentalmente de la suma algebraica de las entradas sinápticas a nivel del soma-segmento inicial para la generación del potencial de acción. En las últimas décadas, sin embargo, el paradigma pasivo y lineal de la dendrita ha sido desafiado por el aporte de un importante caudal de evidencia sólida que demuestra la presencia de una variedad de canales dependientes de voltaje en este compartimiento otorgándole propiedades activas que aportan significativamente a la integración neuronal (11). La presencia de estos canales iónicos dendríticos hace de este compartimiento neuronal un factor esencial en el establecimiento de la función entrada-salida neuronal.

En neuronas del SNC como las células piramidales del hipocampo así como en del neocortex y otras neuronas del SNC (18,19) las propiedades activas del árbol dendrítico adquieren tal complejidad que le confieren a este compartimiento la capacidad de generar respuestas activas propagadas. La electrogénesis dendrítica no solo participa críticamente en el procesamiento de entradas sinápticas (7) sino que se ha demostrado que influye en otros aspectos de la fisiología neuronal como el control del umbral para la generación de fenómenos plásticos sinápticos de larga duración y el establecimiento de la configuración temporal de la descarga de PAs. En células piramidales de CA1 del hipocampo, por ejemplo, una forma característica de respuesta de estas neuronas es a través de ráfagas de potenciales de acción o bursts. Estudios muestran que en la base de la generación de los bursts, esta el fenómeno de despolarización lenta de la membrana plasmática llamada postdespolarización (ADP, de afterdepolarization) (13). En la génesis de este fenómeno se han identificado diferentes canales iónicos. La presencia de canales de sodio voltaje dependientes produce la despolarización necesaria para la activación de canales de calcio dependiente de voltaje, sobre todo del tipo T y R, (13). La actividad combinada de estos canales subyace al fenómeno sub-umbral que permite el desarrollo de bursts de potenciales de acción en este tipo neuronal (13). Es de destacar que el desarrollo de bursts de PAs de forma espontánea, exagerada y sincrónica esta en la base del fenotipo electrofisiológico característico de la actividad epileptiforme. Así, la electrogénesis dendrítica no solamente es determinante de aspectos centrales de la fisiología neuronal sino que adquiere relevancia desde el punto de vista clínico. Alteraciones de la excitabilidad dendrítica se han involucrado en el origen de la epilepsia (1) aspecto que constituye un área de interés personal y que ha motivado en parte la realización de esta pasantía.

Un fenómeno que pone de manifiesto la capacidad electrogénica del árbol dendrítico es la retropropagación de los potenciales de acción (rp-PAs) desde el segmento inicial del axón a las dendritas. Este fenómeno, relativamente reciente de la neurociencia, reta la concepción clásica de la polarización funcional de la neurona descrita por S. Ramón y Cajal en cuyo marco se sostiene que el flujo de información a nivel dendrítico es unidireccional y en el sentido del soma. A continuación reseñaremos someramente las principales conductancias dendríticas operadas por voltaje o por calcio presentes en la dendrita apical de las neuronas piramidales de CA1 que participan del fenómeno de rp-PA y son capaces, en consecuencia, de ejercer un control de la electrogénesis dendrítica. *Corriente de potasio de tipo I_A* . Los canales responsables de esta corriente de salida son operados por voltaje y presentan una activación e inactivación rápida activándose a

potenciales cercanos al reposo. Por sus características cinéticas esta conductancia tiende a contrarrestar las despolarizaciones rápidas sean estas provocadas por corrientes sinápticas como aquellas consecuencia del potencial de acción. Existe evidencia de que estos canales presentan mayor densidad en la dendrita apical distal (5).

Corrientes de potasio dependientes del ión calcio. Los canales responsables son canales de potasio activados por el calcio citosólico que muestran diversos grados de dependencia de voltaje. A nivel dendrítico ha adquirido relevancia la corriente I_{ahp} que es insensible al voltaje y tiene una cinética lenta tanto de activación como de inactivación que acompaña el curso temporal de la concentración intracelular del ión calcio. En relación a su cinética y sensibilidad a bloqueantes como la apamina se han descrito dos tipos de estos canales, uno responsable de la generación de la posthiperpolarización media (mI_{ahp}), y otro de cinética más lenta responsable de la posthiperpolarización lenta (sI_{ahp}) (2). Algunos estudios sugieren que estos canales se distribuyen principalmente a nivel proximal de la dendrita apical (2).

Corrientes de entrada. En este tipo celular se han descrito canales de calcio del tipo T, R y L capaces de sustentar corrientes de entrada en la dendrita apical. Estos canales muestran una distribución uniforme en la dendrita, sin existir diferencias significativas en su densidad a lo largo de la misma (14). Otros canales iónicos particularmente importantes en la electrogénesis dendrítica y en consecuencia en la rp-PA, son los canales de sodio voltaje dependientes. De acuerdo a la cinética de los procesos de activación-inactivación es posible distinguir al menos dos tipos de corrientes de sodio: rápida (o transitoria) y lenta (o persistente). No se describen diferencias en su distribución a lo largo de la dendrita, presentándose con una densidad uniforme, aunque comparativamente baja, a lo largo de la misma (14). Finalmente la corriente mixta de sodio-potasio de tipo I_h , de cinética lenta y activada por la hiperpolarización de la membrana, ha sido recientemente involucrada tanto en el procesamiento de entradas sinápticas como en el control de la excitabilidad dendrítica.

Regulación de la excitabilidad dendrítica y de la rp-PA.

La I_A ha sido involucrada en el control de la probabilidad de ocurrencia de la ADP. En efecto la activación de esta corriente impediría la generación de bursts de potenciales de acción, (13). Lo dicho anteriormente confiere a estos canales una importante función homeostática en la excitabilidad dendrítica, relevante a nivel de la dendrita distal, donde se encuentra la mayor densidad de contactos sinápticos. Dado que la densidad de los canales que median corrientes de entrada es relativamente baja, los rp-PAs muestran conducción decremental. De hecho presenta la particularidad que a nivel de la dendrita distal (más allá de 200 μm) la propagación del potencial de acción es mayormente pasivo (1). En este sentido la presencia de canales de potasio de tipo I_A en la dendrita distal puede contribuir al decremento en amplitud del rp-PA y por tanto la modulación de estos canales redundará en una regulación de la rp-PA (7). Se ha descrito que ciertos neurotransmisores a través de 2º mensajeros y la activación de proteinquinasas (A y C) disminuyen la corriente I_A y por lo tanto aumentan la excitabilidad dendrítica a través del aumento de la rp-PAs. Esta modulación de I_A a través de la actividad sináptica, podría tener importantes consecuencias en los mecanismos de plasticidad sináptica (5).

La actividad neuronal ha sido implicada como factor regulador de excitabilidad dendrítica y por lo tanto de la invasión dendrítica de los PAs a través de la rp-PA (3-7). Existen evidencias que indican que las conductancias de sodio de la dendrita muestran un proceso de inactivación lenta y persistente que podría ser desencadenado por la descarga repetitiva de PAs. Así la propia actividad neuronal podría desfavorecer la rp-PAs. El fenómeno de inactivación lenta también es modulado por segundos mensajeros en un mecanismo dependiente de la actividad. Asimismo y aunque apoyados en

evidencias más débiles (ref), se ha propuesto que la actividad neuronal podría controlar la rp-PAs por activación de la sI_{ahp} . Su localización preferente en la base de la dendrita apical la ubica en un sitio estratégico para el control global de la rp-PA. Asimismo la hiperpolarización provocada por I_{ahp} podría promover la desactivación de I_A , pudiendo incrementar el control ejercido por esta conductancia en la dendrita distal sobre la rp-PA.

Como fuera mencionado, el estudio de los mecanismos responsables de la electrogénesis dendrítica y del control de la invasión del rp-PA podría contribuir al conocimiento de los mecanismos implicados en algunos tipos de epilepsias. Existe evidencia de la alteración de los canales iónicos voltaje dependientes dendríticos en modelos de epilepsia del lóbulo temporal. En estos, se demuestra la afectación del rp-PA hacia la dendrita como consecuencia de esta alteración adquirida en los canales iónicos voltaje dependientes dendríticos (1). En este estudio se muestra además el vínculo existente entre una canalopatía adquirida, la alteración de la electrogénesis dendrítica, evidenciado como un aumento de la rp-Pa, y la existencia de una configuración temporal de la descarga de PAs patológica.

En este marco conceptual general nos propusimos como objetivo general de la pasantía analizar la rp-PA en neuronas piramidales de CA1 de hipocampo de la rata a través del CSDA de potenciales de campo. En particular, con la utilización de protocolos experimentales diseñados específicamente para tal fin, se buscó evaluar la participación de la sI_{ahp} en este proceso. Sin perjuicio de ello, en una primera etapa nos propusimos analizar la fenomenología del obtener entrenamiento en las herramientas electrofisiológicas básicas así como en los procedimientos de análisis de la actividad extracelular en un preparado biológico sencillo.

Materiales y Métodos

Análisis de las corrientes de acción en el nervio ciático de rana.

Se utilizaron ejemplares de rana Toro (*Rana catesbiana*). Luego de realizar la eutanasia por introducción de un estilete en el canal medular (*pithing*) se procedió al aislamiento del nervio ciático por disección siendo luego transferido a una placa de Petri conteniendo suero fisiológico. El nervio aislado se colocó en la cámara de registro, la cual está formada por un orificio alargado realizado en la superficie aislante, de forma que el nervio quede en contacto con la superficie conductora subyacente. Se dispuso de una caja rectangular de plástico donde se montó la superficie que recibe el nervio, esto es un rectángulo de polietileno (que constituye la superficie aislante) con un orificio alargado en el centro que recibirá el nervio y sendos orificios puntiformes orientados en el plano en dos ejes, el eje "x" (paralelo al eje mayor del nervio) y el eje "y" perpendicular al eje mayor, que naturalmente ofician como puntos de registro del potencial de campo ver Fig 1. Debajo de esta superficie se colocó un papel secante que durante el experimento se humedeció con suero fisiológico, oficiando esto como superficie de conducción eléctrica. Se colocó un extremo del nervio en contacto con el electrodo de estimulación y se estimuló el nervio a una frecuencia e intensidad constante, durante las mediciones del potencial de campo. Los parámetros de estimulación se controlaron con un estimulador (Grass S88) y cada estímulo se aplicó a través de una unidad aisladora del estímulo (SIU5). El registro se realizó con un electrodo activo (nichrome) en cada uno de los puntos con coordenadas (x,y) simétricos al nervio respecto de un segundo electrodo (referencia) considerado en el infinito esto

es, con potencial cercano a cero (registro monotópico), ver Fig 1 , así fueron obtenidos en cada punto los registros del voltaje en función del tiempo.

Estudio in vitro de la rp-PA en neuronas piramidales de CA1 de hipocampo de la rata.

Los experimentos de registro extracelular en rodajas de hipocampo fueron realizados por Daniel Lorenzo en el IIBCE en tanto que aquellos en los que se realizaron registros intracelulares en condiciones de fijación de corriente con la técnica de patch se hicieron en la Facultad de Medicina. En los experimentos que implicaron el registro extracelular de la actividad neuronal participamos en el procesamiento de los datos obtenidos. En estos experimentos se realizaron registros extracelulares de campo de la respuesta antidrómica de las neuronas piramidales de CA1 en hipocampo in Vitro en una rodaja frontal de SNC de rata (entre 9 – 15 días de edad). La activación antidrómica de las pirámides de CA1 se obtuvo por estimulación de sus axones en la capa del alveus contigua al stratum oriens. El registro de la señal extracelular se realizó en diferentes puntos a lo largo de un eje paralelo al eje mayor de las células piramidales (Fig 3) con un Δx aproximado de 50 μm desde el stratum piramidale en sentido de la dendrita apical + 400 μm (stratum radiatum) y en sentido de la dendrita basal – 400 μm (stratum oriens).

El protocolo de estimulación consistió en un estímulo único aplicado a los axones de las células piramidales en condiciones de bloqueo de la transmisión glutamatérgica (AP5 50 μM , CNQX 20 μM) y gabaérgica (PTX 100 μM). El papel de la corriente I_A se evaluó observando los efectos de la perfusión de 4-AP (típicamente 3 mM), bloqueante relativamente específico de esta corriente, sobre la rp-PA.

Para indagar acerca de control de la rp-PA ejercido por la sI_{ahp} , el estímulo test fue precedido (400 ms) por un tren condicionante (400 ms de duración, frec. intratren 20 Hz) capaz de provocar la activación de la corriente.

Las respuestas al estímulo único se registraron en las localizaciones antedichas y se obtuvieron series de potenciales de campo de los que se calculó el CSD (ver más abajo), estimando la distribución de las corrientes transmembrana en las diferentes situaciones experimentales

Marco teórico

En este abordaje el PA fue considerado como una onda solitaria que transcurre a lo largo del axon como un dipolo móvil. El potencial generado por la actividad eléctrica de todas las fibras que componen el nervio, en un punto de un conductor de volumen, representaría la suma lineal de la contribución de cada dipolo como si el potencial desarrollado por cada dipolo fuera independiente (principio de superposición). Esto último implica que hasta los dipolos generados por esta actividad, lejanos al electrodo de registro, contribuyen también al registro de campo independientemente del resto de los dipolos. Considerando que el potencial desarrollado por cada dipolo es una magnitud vectorial, el voltaje registrado en un punto dependerá también de las características geométricas donde este dipolo se desarrolla. La dificultad en la deducción de las características del dipolo y su propagación de acuerdo al campo generado en un conductor de volumen, se incrementa con la complejidad geométrica del tejido en el que estos se desarrollan. En orden de interpretar en el SNC el origen y mecanismos de producción de la señal extracelular generada por una población de neuronas, es importante remarcar entonces que es central conocer la geometría tisular y

el arreglo geométrico de las neuronas que generan el registro de campo para llegar entonces a interpretaciones válidas sobre el fenómeno estudiado. En base a la estructura de la corteza del hipocampo (20), tenemos en ella una estructura laminar con neuronas dispuestas en capas cuyos somas ocupan una capa y las dendritas otra. Dada esta geometría pueden sustituirse los somas por un equivalente único esférico y las dendritas por un elemento equivalente cilíndrico en la misma orientación que el eje del árbol dendrítico, esto es un equivalente de los compartimentos de la neurona inscriptos en el plano (modelo que se puede aplicar solo si existe una geometría tisular especial). Notar que las características de este modelo equivalente, tienen similitudes geométricas con el preparado tratado en la medición del potencial de campo en un conductor de volumen del artículo de Lorente de No (9). Al perfil de potencial de campo desarrollado por este arreglo de neuronas (la mayoría de los preparados de estructuras corticales tienen estas características) se lo denomina campo abierto (4-12). El registro de potencial de campo en esta población de neuronas de disposición ordenada tiene una propiedad importante, que es la posibilidad de topografiar la señal a un compartimento neuronal, propiedad directamente vinculada con el arreglo geométrico de esta estructura tisular. Pese a ello, es importante remarcar, que el registro de campo en un punto no solo se da por la activación de los compartimentos inmediatamente próximos al sitio de registro, si no también a elementos generadores lejanos. Por lo tanto surge el problema de la resolución espacial del fenómeno, es decir, cuando hay una negatividad en registro de campo o positividad ¿realmente hay sumidero o una fuente respectivamente inmediato al sitio de registro?.

Este problema en la interpretación de la señal extracelular, nos lleva a utilizar una herramienta matemática que nos permita localizar más detalladamente e interpretar los datos de potencial de campo.

Ahora supongamos que tenemos un volumen de tejido que contiene al locus donde se generan las fuentes de corriente (sabiendo que el flujo de corriente J a través de una

superficie S , es $\int_S \vec{J} \cdot d\vec{s}$). Si tenemos en cuenta este volumen, como expresión de

conservación de la corriente se tiene

$$\oint_S \vec{J} \cdot d\vec{s} = \int_V I dv \quad \text{ecuación (1)}$$

siendo I la intensidad de corriente dentro de este volumen, surge la dificultad de resolver esta ecuación que presenta una magnitud vectorial. La forma de integrar una magnitud vectorial con estas características es aplicando el teorema de Gauss a este volumen (4), (teorema que no se demostrara) cuya expresión aplicada a nuestro modelo es:

$$\oint_S \vec{J} \cdot d\vec{s} = \int_V I dx \quad \text{ecuación (2)}$$

Siendo la divergencia el producto escalar del gradiente por el flujo eléctrico $\nabla \cdot J = \left(\frac{\partial J}{\partial x} + \frac{\partial J}{\partial y} + \frac{\partial J}{\partial z} \right)$, sustituyendo (2) en (1) se tiene,

$$\int_V \nabla \cdot J = \int_V I dx \Rightarrow \quad \nabla \cdot J = I \quad \text{igualdad (1)}$$

Tenemos como expresión de ley de ohm :

$$J = \sigma E \quad \text{ecuación (3)}$$

y sabiendo que el campo eléctrico E es igual al gradiente de potencial:

$$E = -\nabla \phi \quad \text{ecuación (4)}$$

siendo la expresión ϕ el potencial eléctrico, sustituimos (3) en igualdad (1) y tenemos $\nabla \cdot (\sigma E) = I$ y por sustitución en la ecuación (4)

$$\Rightarrow \nabla \cdot [\sigma(-\nabla \phi)] = I \quad \Rightarrow$$

$$-\sigma \nabla \cdot (\nabla \phi) = I \Rightarrow -I = \sigma \nabla^2 \phi \Rightarrow -I = \sigma \left(\frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \phi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} \right)$$

Esta es la expresión completa de la densidad de fuentes de corriente (Current Source Density, CSD) siendo σ la conductividad del medio la cual varía en cada dimensión existiendo tres componentes σ_x , σ_y , σ_z con lo cual la expresión completa

$$\text{queda: } I = \sigma_x \frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} + \sigma_y \frac{\partial^2 \phi}{\partial y^2} + \sigma_z \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2}. \quad \text{ecuación (5)}$$

Al análisis del potencial de campo de acuerdo a esta expresión matemática se lo denomina CSDA (current source density análisis). En un artículo del año 1975 de Nicholson y Llinás (17), estiman en el cerebelo de gato, la densidad de corriente con un arreglo de siete electrodos dos en cada eje del espacio contando también con la magnitud de la conductancia medida en cada eje de acuerdo a la expresión matemática deducida anteriormente en el texto (8-16).

En nuestro preparado tenemos una estructura laminar en la cual podemos asumir, aunque naturalmente esto pueda ser fuente de error, que en una capa dada las estructuras contenidas en ella se activan conjuntamente, es decir al mismo tiempo en el eje z e y. En este caso el potencial de campo varía solo en el eje perpendicular a la capa en la cual se produce la activación (eje paralelo a la orientación de las neuronas en la estructura,

que nosotros llamamos eje x). Así podemos decir que, $\frac{\partial^2 \phi}{\partial y^2} = \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} = 0$, queda

la expresión del CSD como la siguiente

$$I = \sigma x \frac{\partial \phi}{\partial x}^2. \quad \text{ecuación (6)}$$

Medición práctica del CSD. En una estructura laminar podríamos aproximar que σ tiende a ser constante, lo cual coincide con datos experimentales (16) . Por lo tanto queda la expresión del CSD como una ecuación en la cual se obvia la conductividad:

$$\text{CSD} \cong \frac{\partial \phi(t)}{\partial x}^2 \quad \text{ecuación (7)}$$

Expresión unidimensional de la función CSD. Si bien a través de esta función no se puede medir directamente la densidad de corriente, la función no pierde sus propiedades, dado que mantiene la capacidad de resolución para detectar fuentes y sumideros.

En el preparado de Hipocampo se obtuvieron registros extracelulares en puntos equidistantes entre sí, del potencial de campo (ver Fig. 3)

Con la obtención de estas mediciones se aplica la ecuación (5), obteniéndose la expresión matemática del CSD unidimensional:

$$\frac{\frac{Vb - V0}{\Delta x} - \frac{Vo - Va}{\Delta x}}{\Delta x} = \frac{Va - 2V0 + Vb}{\Delta x^2} = \text{CSD} \quad \text{ecuación (8)}$$

El CSDA permite interpretar de una manera más rigurosa la señal extracelular al tiempo que hace posible obtener datos acerca de la actividad eléctrica de varios compartimentos neuronales a la vez y describir la actividad eléctrica de compartimentos neuronales inaccesibles a otras técnicas electrofisiológicas.

Resultados y Conclusiones.

Estudio del potencial de campo desarrollado por el nervio aislado medido en un conductor de volumen.

Con el arreglo experimental antes descrito en la sección de materiales y métodos, se obtuvieron los registros del potencial de campo en función del tiempo en los puntos del plano (x,y) seleccionados. Basándonos en esto, y en la interpretación de los registros en la bibliografía (9). Tomamos los registros de potencial de campo en función del tiempo en los puntos predeterminados de la superficie de registro (solo algunos de ellos), luego tratamos de construir un grafico de un instante del proceso de activación. Hacemos esto fijando un tiempo igual para todos ellos t_2 (en la Fig. 1-D, t_2 señalado

con una flecha), este tiempo es el tiempo transcurrido desde el artefacto de estímulo al instante 2 en cada uno de los registros del plano. Si suponemos que el potencial de acción (dada la corta longitud del nervio) se conduce a una velocidad comparativamente elevada y constante a lo largo del elemento excitable, podemos entonces tomar con las mediciones realizadas en el conjunto de puntos del plano en un tiempo dado como si fuera una “instantánea” o foto del proceso de activación en este tiempo t_2 . Así, se pudo construir, tomando los valores de amplitud y polaridad del campo eléctrico en cada punto del plano, el gráfico representativo del proceso de activación. En el gráfico se trazaron las líneas equipotenciales con su respectiva polaridad, y perpendiculares a ellas, las líneas de corriente cuyo sentido se establece por convención física (Fig. 1-E). Nótese que existen sectores de la superficie del nervio de donde estas líneas de corriente emergen a las cuales llamaremos fuente y otros sectores donde estas líneas se extinguen a las que llamaremos sumidero. Es la sucesión de puntos donde se suceden fuentes y sumideros lo que nos habilita a modelar este fenómeno como un dipolo que se desplaza en el sentido de conducción del fenómeno eléctrico. El dipolo eléctrico es un descriptor físico-químico que en este contexto representa la dirección, sentido y magnitud de la activación del grupo de axones desde un extremo al otro del nervio (cuya expresión matemática es $\vec{\mu} \equiv q.d$, siendo q la carga en coulombs y d la distancia en metros entre la carga positiva y negativa).

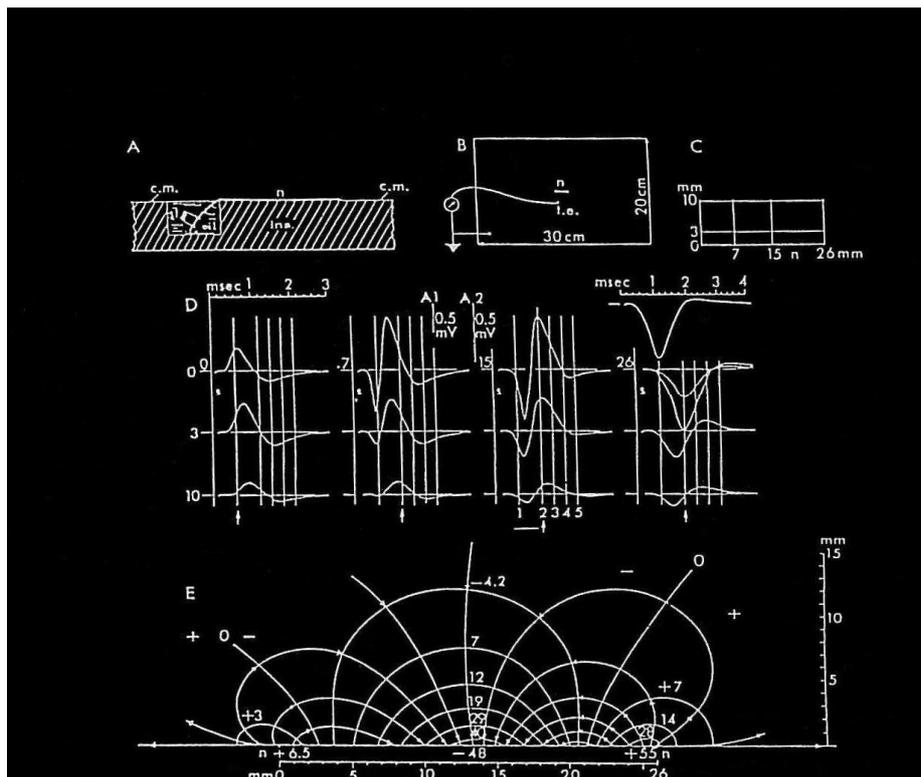


Figura 1- Esquema modificado de Lorente de Nó (1947) de Llinás.R y C.Nicholson, “Handbook of electroencephalography and clinical Neurophysiology” 1974. En este experimento se estudia el potencial de campo generado por el potencial de acción compuesto generado por un nervio, medido en un conductor de volumen. En A; B y C se ilustran detalles del arreglo experimental utilizado. En (A) el segmento de nervio (n) es puesto sobre un material de soporte aislante (ins), cubierto por un medio conductor (c.m.). Este medio conductor consiste en una hoja de papel secante mojado con solución Ringer. Uno de los extremos del nervio se sumerge en aceite (oil) es en este extremo donde se estimula el nervio a través de un electrodo bipolar.(B) en el cual se ilustra el electrodo de registro (monotópico). (C)

en este eje de coordenadas se toman los registros de potencial eléctrico que se muestran en (D) en abscisas x ordenadas y. (D) Registros de campo obtenidos en las doce posiciones marcadas en (C) del electrodo de registro. En (E) diagrama de campo eléctrico, construido con los potenciales de campo (ejes en (x) paralelo al eje mayor del nervio e (y) perpendicular el eje mayor). En este gráfico se ilustran líneas que ingresan y salen del nervio (líneas de corriente) y perpendiculares a ellas líneas isoelectricas tomadas en un instante de referencia. La polaridad de las líneas isoelectricas determina la dirección del flujo de corriente.

Con los datos obtenidos, tomamos constante un punto en el eje “y” tomando diferentes puntos paralelos al eje mayor de nervio que nosotros denominamos eje x, ver figura 1 D, por ejemplo en los registros a 0.3 mm del nervio en el eje y, tomamos un punto próximo al electrodo de estimulación (en el practico original ver Fig 1 C en el eje x se toman los puntos 0, 7, 15 y 26 mm). Si observamos estos registros vemos en el registro mas próximo al electrodo de estimulación (punto 0 mm en eje x en Fig 1), se obtiene un registro potencial de campo en función del tiempo bifásico negativo-positivo. Interpretamos en el que la negatividad se correspondería con el sumidero resultante de la activación de la membrana frente al electrodo de registro y la positividad guardaría relación con la fuente resultante del proceso de repolarización del potencial de acción. De acuerdo a los datos obtenidos en otro tipo de experimento es posible plantear que el sumidero coincide con la corriente de sodio entrante en el potencial de acción a través de canales de sodio voltaje dependientes en tanto que la fuente sería debida a la salida de potasio a través de canales de potasio voltaje dependientes. Ahora, si tomamos puntos intermedios entre ambos extremos por ejemplo puntos de 7 mm a 15 mm en el eje x tendremos un registro trifásico (positivo-negativo-positivo) ver Fig. 1 y Fig 2. Obtenemos en este caso una positividad inicial se correspondería con la fuente responsable del proceso de propagación de estas corrientes iónicas hacia el sitio de registro, esto es una fuente pasiva que luego de propagada por el axoplasma genera una corriente saliente (fuente) que carga el capacitor y despolariza la membrana plasmática regenerando el potencial de acción en este nuevo punto distal del nervio, la negatividad corresponde con la llegada del potencial de acción a este punto y la última positividad corresponde a la fuente responsable de la repolarización de este segmento de membrana. En un punto distal, es decir cerca del extremo truncado del nervio punto (2,6 mm eje x), el registro es fundamentalmente positivo, faltando la negatividad correspondiente al sumidero por ser el extremo truncado y por tanto inexcitable, (ver Fig 1 D registro del extremo opuesto al electrodo de estimulación 26 mm).

Por lo expuesto, las características del fenómeno bioeléctrico que podemos registrar desde el espacio extracelular, nos permiten representar el proceso de conducción del potencial de acción en un nervio aislado como un dipolo móvil. Debemos tener presente que en este caso, el dipolo móvil representa la propagación del potencial de acción de un extremo al otro del nervio, fenómeno de membrana que esta determinado a su vez por las corrientes transmembrana sin las cuales no existirían las diferencias de potencial extracelular que constituye el potencial de campo así como por la geometría del preparado experimental (como ya se sostuvo en el marco teórico). El análisis del potencial desarrollado por un generador lineal móvil inscripto en un conductor de volumen como el expuesto ofrece ventajas tanto en cuanto a la interpretación del fenómeno observado como para el análisis cualitativo y cuantitativo del PA registrado que luego serán profundizadas.

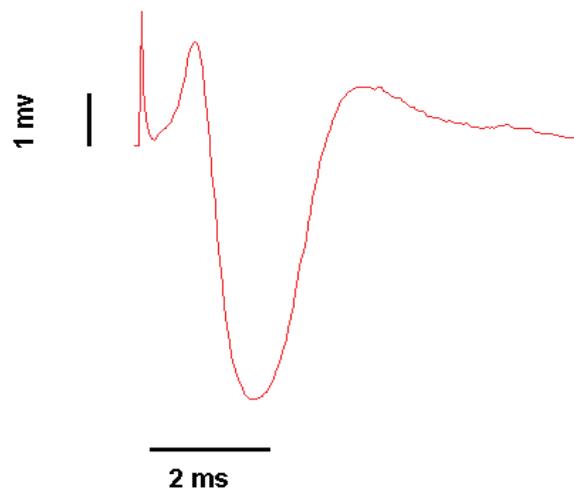


Figura 2 –Registro típico de campo en un conductor de volumen generado por el potencial de acción compuesto en nervio ciático de Rana. El sistema de registro ha sido calibrado de manera tal que una negatividad del electrodo activo produce una deflexión del registro hacia abajo.

Análisis del potencial de campo desarrollado por una población de neuronas de la corteza cerebral del hipocampo de rata en neuronas piramidales de CA1.

En esencia el estudio de rp-PA en este preparado podría abordarse siguiendo el mismo marco formal que en la etapa anterior. Sin embargo el hecho de que las señales sean generadas por una población de neuronas y sus prolongaciones así como las peculiaridades geométricas de los elementos excitables involucrados hacen que el análisis adquiera características propias. A los efectos de analizar el papel de ciertas conductancias de potasio en el control de la rp-PA en primera instancia se llevó a cabo una caracterización primaria del rp-PA en las neuronas piramidales de la corteza de hipocampo en CA1 utilizando el marco formal del CSDA.

Para realizar este análisis se aplicó el estímulo a nivel del alveus con el objeto de provocar la activación antidrómica de las neuronas piramidales de CA1. Como se detallara mas arriba, los experimentos se realizaron en presencia de bloqueantes de la transmisión sináptica rápida para evitar su eventual contribución a las respuestas al estímulo aplicado en el alveus. En el registro intracelular obtenido en condiciones de bloqueo de la transmisión sináptica rápida, tanto la forma de onda del PA registrado así como su corta latencia sugieren fuertemente su carácter de antidrómico. Como se observa en la Fig. 4 , la actividad de campo se superpone prácticamente con la dV_m/dt del PA registrado intracelularmente. Esta correspondencia sugiere que la actividad registrada extracelularmente correspondería al PA antidrómico. En efecto por tratarse de una señal relativamente rápida (V_m cambia mucho mas rápido que la constante de tiempo de la membrana), el potencial de campo es proporcional al dV_m/dt ($I_m \cong C_m(dv/dt)$).

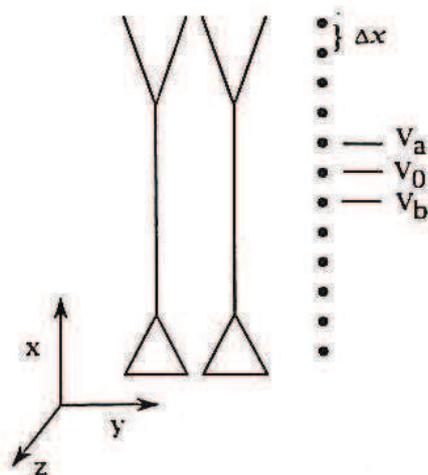


Figura 3- Esquema del procedimiento para la obtención de potenciales de campo y ulterior estimación del CSD unidimensional en neuronas piramidales de Hipocampo. Con tres puntos sucesivos en los que se registra el potencial se obtiene un punto de CSD. En nuestros experimentos el Δx es aproximadamente es $50 \mu m$. En el sistema de ejes representado, solo tomamos la variación de potencial generado por la población de neuronas en el eje de activación (x), (ver fundamentación en marco teórico) Tomado de Daniel Johnston y Samuel Miao-Sin Wu (6).

Confirmada la naturaleza antidrómica de los PAs generados por la estimulación a nivel del alveus, se analizó la propagación de estos PAs al árbol dendrítico apical. Para ello, las respuestas generadas se registraron en varios puntos distribuidos a lo largo del eje de las células piramidales como se ilustra en la Figura 3. En estas condiciones es posible observar que la espiga antidrómica de población genera un campo bifásico (negativo-positivo) a nivel del soma de las células piramidales (Ver Fig. 6 control, trazado $0 \mu m$). Esta actividad se propaga hacia las dendritas apicales (valores positivos de posición) pudiendo detectarse una negatividad tardía a distancias cercanas a las $200 \mu m$. Esto sugiere la propagación activa del rp-PA a la dendrita. Notar la similitud en el perfil de registros en rata y los datos obtenidos del practico de nervio, lo cual esta determinado por la arreglo geométrico de la población de neuronas (corteza). El conjunto de neuronas así dispuestas, permite modelar la fuente electrogénica de potencial extracelular como un generador lineal inscripto en un conductor de volumen, similar al PA compuesto del nervio aislado en un conductor de volumen. Luego de caracterizado el fenómeno en situación control se realizaron varias maniobras para evaluar el papel de las conductancias de potasio (I_A e sI_{ahp}) en la rp-PA.

En primer lugar, en la serie de potenciales de campo, se evaluó el efecto de 4-aminopiridina (4-AP) en la excitabilidad y en la rp-PA en estas células (Fig. 5, derecha). En situación control, en sitios de registro distales al soma ($< 200 \mu m$) a lo largo de la dendrita apical, el PA muestra una morfología bifásica típica caracterizado por una onda positiva (coincidente con la negatividad somática) y una negatividad tardía sugiriendo la propagación activa del PA. En presencia del bloqueante de la corriente I_A esta negatividad tardía se hace evidente en localizaciones aún mas lejanas del soma ($\sim 300 \mu m$) en el stratum radiatum (ver Fig. 5, derecha). Aunque las modificaciones provocadas por 4-AP no resultaron muy claras en nuestro experimento, la constatación de la negatividad tardía en localizaciones mas alejadas del soma que en la situación

control sugiere un incremento de la rp-PA observación consistente con lo reportado acerca del control de la rp-PA ejercido por I_A (5-7-13).

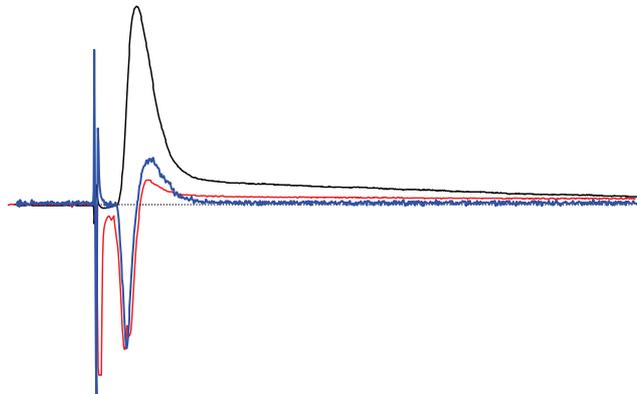


Figura 4 – Esquema que muestra la correlación entre el potencial de campo obtenido a nivel del stratum pyramidale (rojo), el registro intracelular somático (negro) y la derivada primera del registro intracelular (azul). Notar que el trazado de dV_m/dt se superpone con el del registro de campo (comentario en Texto).

Para analizar el papel de la sI_{ahp} en la rp-PA se diseñó un protocolo de estimulación a través del cual se pudo evaluar la rp-PA durante la activación de la corriente provocada por un tren condicionante (ver Procedimiento experimental y Fig. 6^a dcha. e izq.). Nuevamente el estímulo fue aplicado en el alveus y los registros se obtuvieron en presencia de bloqueantes de la transmisión sináptica rápida. La aplicación del estímulo test aislado (protocolo en la Fig. 6A, izquierda), provoca la descarga antidrómica de las células piramidales de CA1. En el mapa de contorno del potencial de campo (Fig. 6B izq.) es posible detectar una negatividad neta a nivel dendrítico hasta una distancia del orden de las 250 μm del soma. En estas condiciones de estimulación, el CSDA unidimensional muestra un sumidero cercano al soma y otro a nivel dendrítico en el entrono de las 200 μm del soma. El sumidero somático se acompaña de una fuente ubicada a nivel de las dendritas basales.

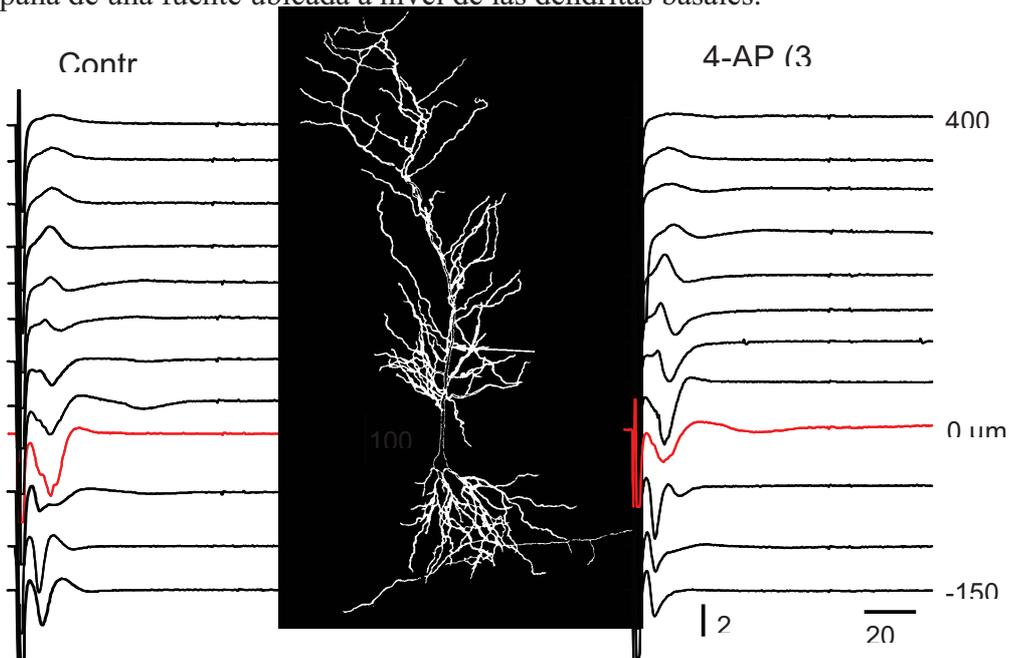


Figura 5- Perfiles de la actividad de campo generada por la activación antidrómica de las pirámides de CA1 (esquema en el centro) durante la perfusión con solución control (izquierda) y con solución conteniendo 4-AP (3 mM). Los potenciales se registraron a nivel del stratum pyramidale (0 μm , trazado rojo) y en posiciones progresivamente más alejadas del soma ($\Delta x = 50 \mu\text{m}$) hacia el stratum radiatum (valores positivos de posición) y hacia el stratum oriens (valores negativos de posición). Para claridad se incluyen algunos números a la derecha que ilustran la posición a la que fueron obtenidos los registros correspondientes. En cada registro la deflexión hacia arriba corresponde a registros positivos y hacia abajo negativos (6).

Cuando el estímulo test es precedido por (400 ms) por el tren condicionante (probable pico de I_{ahp} , FIG 6A, dcha.) se observa tanto en el mapa de contorno del potencial de campo (Fig. 6B, derecha) como en el CSD (Fig. 6C derecha) que la propagación del PA a nivel dendrítico se reduce significativamente respecto del control. En efecto, la negatividad a nivel dendrítico reduce su amplitud y se extiende apenas hasta las 200 μm del soma (Fig. 6B, derecha). En el CSD (Fig. 6C, derecha) el sumidero lejano observado en ausencia de tren condicionante no se detecta y la fuente en las dendritas basales parece incrementarse.

Aún cuando los efectos del tren condicionante son claros, no podemos afirmar que la reducción de la rp-PA obedezca exclusivamente a la activación de la sI_{ahp} por efecto shunt de esta corriente en la base de la dendrita apical. Esto debería poder evidenciarse como la aparición de una fuente neta en esta localización. Además, dado que la activación de esta conductancia puede acompañarse de hiperpolarización, provocando la desactivación de I_{A} , los efectos observados podrían obedecer a un incremento del efecto de I_{A} en la dendrita distal. Finalmente la reducción aparente del sumidero somático podría indicar que el PA antidrómico precedido por el tren condicionante pudiera estar afectado en su amplitud debido al fenómeno de inactivación lenta de los canales de sodio involucrados en la respuesta (3). Estas derivaciones deben sustentarse en hallazgos derivados de nuevas series experimentales.

Comentarios y discusión general

Un aspecto eventualmente trascendente que emerge de este trabajo consiste en que, en células piramidales de CA1 de hipocampo de la rata, sI_{ahp} e I_{A} podrían constituir un binomio homeostático cuya función es la regulación de la excitabilidad dendrítica, en un mecanismo dependiente de la actividad. Obviamente estas conclusiones deben ser apoyadas por otros experimentos en el futuro. A través de la operación combinada de estas conductancias la actividad neuronal podría provocar una disminución de la rp-PAs particularmente en la dendrita distal y como consecuencia de esto, la disminución de la formación de Bursts de potenciales de acción con la consecuente regulación de la entrada de calcio a la célula. La propia actividad neuronal podría poner en marcha la activación combinada de estas conductancias reduciendo así la excitabilidad dendrítica. En este proceso, la homeostasis del calcio citosólico, a través de la modulación de la sI_{ahp} desempeñaría un papel importante. Tanto el control de la concentración intracelular de calcio como el de la excitabilidad dendrítica por I_{A} y sI_{ahp} muestran modificaciones en modelos experimentales de epilepsia (1, 15).

El grupo de enfermedades que cursan con una alteración adquirida o heredada en los canales iónicos se conocen como canalopatías. Es necesario remarcar que la alteración de los canales iónicos en procesos patológicos, la alteración de la regulación de la excitabilidad dendrítica y el consecuente desarrollo de un patrón temporal de activación anormal, configura la secuencia fisiopatológica y el marco conceptual abordado en este informe. Si bien estos puntos no fueron abordados de forma completa

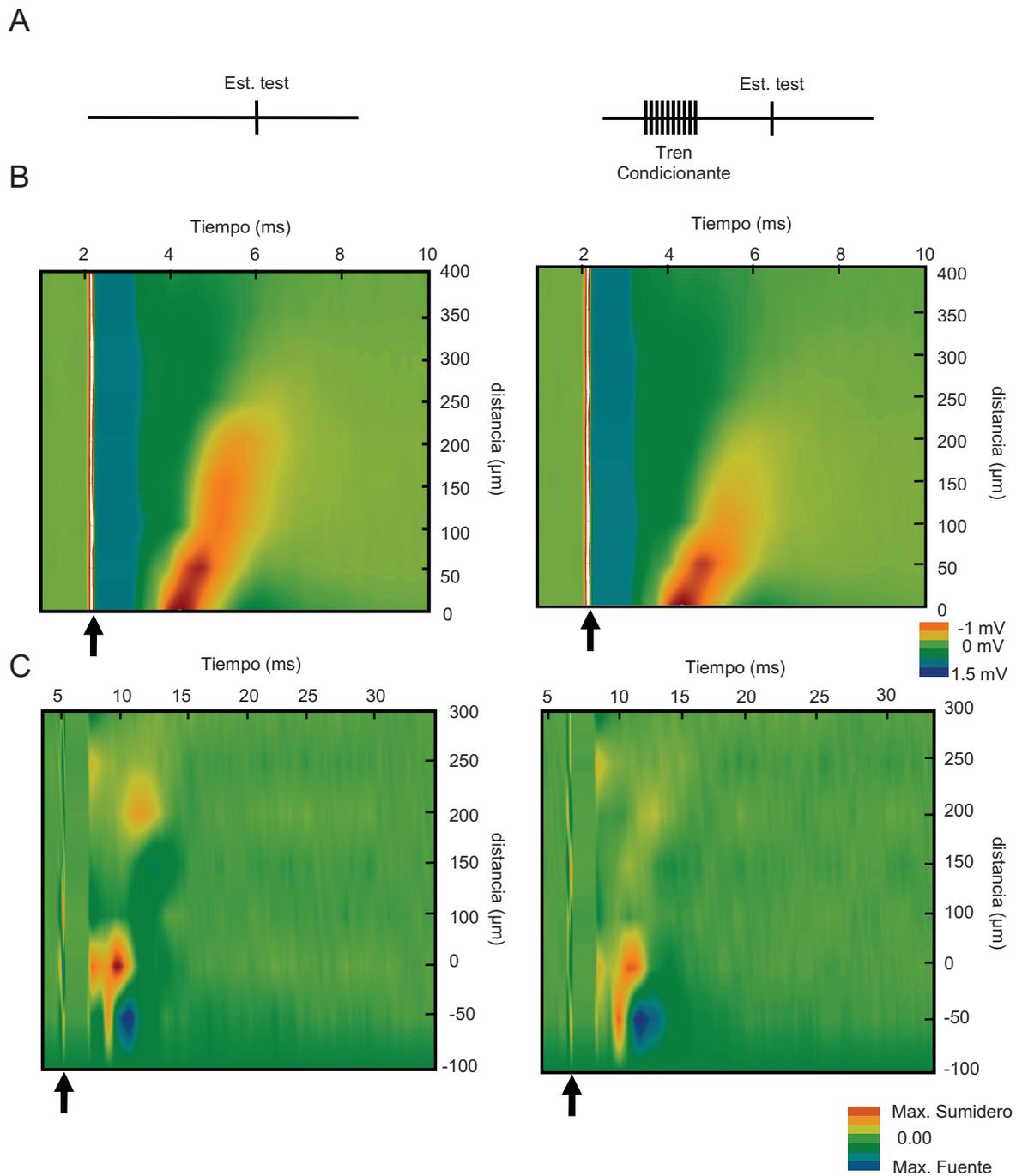


Figura 6- Evaluación de los efectos de la sI_{ahp} en la rp-PA. A, protocolos de estimulación utilizados. B. mapas de contorno del potencial de campo en ausencia (izquierda) y en presencia de tren condicionante (derecha) C.- CSD unidimensional, en ambas condiciones experimentales. Nótese la disminución de la señal correspondiente al potencial de acción retropropagado cuando ocurre durante la sI_{ahp} (gráfico inferior de la derecha) en comparación con el registro control. La flecha en todos los gráficos señala el artefacto de estímulo.

en la actividad experimental, esta temática forma parte del área de interés personal y es compartido por el grupo de trabajo.

Referencias

- 1-Bernard C, Anderson A, Becker A, Poolos NP, Beck H, Johnston D, “Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy”, *Science*, 2004, 305(5683), pp532-5
- 2-Cabezas C, Martin E, Buño W “Mecanismos celulares reguladores de la excitabilidad celular, implicaciones funcionales y en epilepsia”. *Rev Neurol* 2003;36(8), pp 738-743
- 3-Costa.C, Magee JC, Hoffman DA, Johnston D .“Slow Recovery from Inactivation of Na Channels Underlies the Activity – Dependent Attenuation of Dendritic Action Potentials in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons” *J. Neurosci.* 1997, 17(17), pp 6512-6521
- 4- Feynman R, Leighton R, “The Feynman Lectures on Physics” Addison- Wesley Publishing Company (Massachusetts E.U.A), 1964, pp 2-1 a 4-17.
- 5- Hoffman.A , Magee.J , Costa.M, Colbert & Johnston , “ K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons”. *Nature* , 1997, vol 387.
- 6- Hubbard JI, Llinás R, Quastel.D.M.J “Electrophysiological análisis of synaptic transmission”.The Williams & Wilkinns Co, Baltimore, 1969.
- 7- Johnston D, Magee J,” Regulation of Back Propagation action potential in hippocampal neurons”, *Curr. Op. Neurobiol.* 1999 (9), pp 288-292.
- 8- Johnston D, Wu S, “Foundations of Cellular Neurophysiology”, MIT press 1994, pp 423 a 439
- 9- Lorente De Nó R. “A Study of Nerve Physiology”, Studies From The Rockefeller Institute from Medical Research 1947.
- 10 –Llinás. R, “ The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function.”, *Science* , 1988 , vol 242 (4886) , pp 1654-64.
- 11-Llinás.R, Hess.R , “Tetrodotoxin-resistant dendritic spikes in avian Purkinje cells”. *Proc Natl Acad Sci* , 1976 ,73(7), pp 2520-3
- 12-Llinás R, Nicholson C, “Handbook of electroencephalography and clinical Neurophysiology” Amsterdam Elsevier 1974 (2) pp 61-83
- 13-Magee J, Carruth M, ”Dendritic Voltage – Gated ion Channels regulate the Action Potential Firing Model of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons”. *J Neurophysiol* , 1999, Vol. 82 (4), pp. 1895-1901
- 14-Magee.J, Johnston.D , “ Characterization of single voltage- gated Na⁺ and Ca⁺⁺ channels in apical dendrites of rat CA1 pyramidal neurons” *Journal of Physiology* , 1995 , 487.1 , pp 67-90.
- 15- Martin.D.E, Araque A, Buño W, “Synaptic Regulation of the Slow Ca⁺⁺ activated K⁺ current in hippocampal CA1 Pyramidal Neurons: Implications in Epileptogenesis”. *J Neurophysiol.*, 2001, Vol. 86(6) , pp. 2878-2886
- 16- Nicholson C, ”Generation and analysis of extracellular field potentials”, (New York University. Department of Biophysics and Physiology)
- 17- Nicholson C, Llinás R, ”Real time current source density analysis using multi-electrode array in cat cerebellum”. *Brain Res Dec* 1975, 19; 100(2):418-24
- 18- Stuart.G , Sprouston.N, Sakmann.B , Hausser.M, “Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS”, *Trends Neuroscience* , año 1997 ; vol 20(3), pp 125-31.

- 19- Stuart.G & Sakmann.B , “Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites”, *Nature* , 1994, vol 367(6458) , pp 69-72 .
- 20-Teyler TJ, DiScenna P, “The Topological Anatomy of the Hippocampus: A Clue to its function”. *Brain Res. Bull.* 1984, vol 12 pp

Conclusiones generales de la pasantía: desde el punto de vista tanto personal como académico el desarrollo de esta pasantía por el Laboratorio de Neurofisiología Celular dirigido por Michel Borde (Tutor de LBH) fue muy positivo. En primer lugar me ayudó a entender como factible, la formación de grupos interdisciplinarios básico-clínicos para el abordaje de temas en cualquiera de estas áreas. Desde el punto de vista personal, mas específicamente en lo procedimental, existió un avance desde este punto de vista dado que personalmente carecía de experiencia en cuanto al manejo de técnicas en electrofisiología siendo mi conocimiento previo del tema solo teórico. En lo personal, la visión del trabajo en ciencia experimental es muy importante tanto desde el punto de vista epistemológico, en la metodología de trabajo para el abordaje de un problema concreto, como en las dificultades diarias en la ejecución de lo planeado, barreras diarias que debe sortear el experimentador y que hacen a la práctica diaria así como la resolución de estos obstáculos a la formación del investigador. El funcionamiento de un laboratorio y el trabajo en grupo, el conocimiento de estos tópicos de la actividad experimental fue muy rica y forman parte de un enorme activo fruto del desarrollo de esta pasantía. En síntesis, independientemente del camino personal a tomar en mi formación tanto lo aprendido como los nexos generados son fundamentales en futuros emprendimientos siendo la voluntad personal de aquí en mas, dentro de mis posibilidades, la de promover y apoyar estos espacios de generación del conocimiento en cualquiera de sus formas.

Agradecimientos: al equipo docente del laboratorio de Neurofisiología Celular (Departamento de Fisiología), Michel Borde , Héctor Kunizawa y Virginia Comas (Facultad de Medicina de la UDELAR), a Ernesto Blanco, docente de la Facultad de Ciencias (Departamento de Física) quien orientó mi búsqueda bibliográfica en aspectos de Física y Matemática importantes para este informe, y especialmente a Daniel Lorenzo del Departamento de Neurofisiología del IIBCE por la realización de los experimentos de registro de campo en Hipocampo de Rata (rodaja de SNC in Vitro

Universidad de la República Oriental del Uruguay

Licenciatura en Biología Humana

Tesis de Grado:

“Estudio morfofuncional de la vagina en animales prepúberes y adultos con autoinjerto heterotópico de ovario, con diferentes períodos postinjerto”

María Jimena Mas de Ayala Operti

Orientadora: Dra. Rebeca Chávez-Genaro

**Lugar: Laboratorio de Neuroendocrinología de la Reproducción,
Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina,
Universidad de la República**

“It was noted prior to the 1900s that a number of changes in the reproductive tract occur as a result of ovariectomy, and the ability of ovaries transplanted into castrated female animals to ameliorate these effects demonstrated that this gland produced a substance(s) that acted in an endocrine manner. This conclusion was supported by the observation that accessory reproductive organs, such as the vagina and the uterus, underwent cyclical changes in a fashion similar to the ovaries.” (Smith, 1998)

RESUMEN

El ovario es el órgano formador de gametas femeninas, desempeña importantes funciones endócrinas a través de la secreción de hormonas esteroideas: estrógenos y progesterona. El útero y la vagina son órganos blanco de dichas hormonas y en los mamíferos presentan variaciones histológicas relacionadas con el patrón de secreción hormonal durante el ciclo sexual. Se ha descrito que la funcionalidad del ovario (ovulación y secreción de hormonas) se mantiene incluso cuando el órgano (por razones de investigación o médicas) es transplantado a otros sitios de la economía.

Desde hace algunos años, se plantea la extracción de tejido ovárico como una herramienta que permite a) estudiar los procesos de foliculogénesis en diversos modelos animales incluyendo al humano, b) estudiar los procesos que llevan a la funcionalidad del injerto y su vida media y c) la restauración de la función ovárica después de quimioterapia en humanos. Sin embargo poco se conoce acerca de las modificaciones que éste procedimiento produce sobre sus órganos blanco.

En este contexto, nos propusimos estudiar cómo la vagina, uno de los órganos blanco de las hormonas ováricas, responde al proceso de autoinjerto subcutáneo de ovario en ratas prepúberes o adultas y en diferentes lapsos postoperatorios.

Los resultados muestran que, el autoinjerto de ovario en la etapa prepuberal provoca una disminución significativa del tamaño de la vagina en la edad adulta, básicamente debida a una hipotrofia de la capa muscular. La reducción de tamaño producida por el autoinjerto de ovario en la etapa adulta es menos evidente.

Los mecanismos por los cuáles ocurren estos cambios son poco entendidos, pero al parecer están vinculados al desbalance hormonal que se produce al cambiar de localización de la gónada femenina.

INTRODUCCIÓN

La reproducción depende de interacciones entre los componentes del aparato reproductor, el sistema neuroendocrino y el medio ambiente. En las hembras de los mamíferos, el sistema reproductor comprende los órganos internos (ovarios, oviductos, útero, vagina y glándula mamaria) y los genitales externos, todos ellos orquestados en las diferentes etapas de la vida del individuo para lograr la formación y maduración de la gameta femenina. Los ovarios son las gónadas de las hembras y son responsables de la formación de los gametos (ovocitos) y de la síntesis de las hormonas necesarias para la regulación cíclica de las funciones reproductivas, entre ellas los estrógenos y la progesterona. (Bahr & Humphrey, 1998). La regulación cíclica de las funciones ováricas ocurre de forma simultánea con la liberación de hormonas hipotalámicas e hipofisarias, dando lugar a un circuito neuroendócrino, denominado eje Hipotálamico-Hipofisiario- Gonadal (HHG). La sincronía de este circuito se traduce en la presencia del ciclo menstrual en primates ó del ciclo estral, como se conoce en otros mamíferos. Su periodicidad varía en duración entre las especies; en la mujer tiene un promedio de 28 días mientras que en las ratas es de 4 o 5 días. El comienzo de cada ciclo es regulado por la secreción pulsátil de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), una neurohormona secretada desde el hipotálamo que es transportada directamente hacia la hipófisis a través de la circulación portal. En la hipófisis estimula la liberación de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) a la circulación sanguínea para actuar a nivel ovárico promoviendo el desarrollo folicular y la ovulación. El desarrollo y maduración de los folículos ováricos se acompaña de la producción de hormonas esteroideas que actúan sobre el propio Sistema Nervioso Central y sobre otros órganos de la economía (Liu, 1993). (Figura 1)

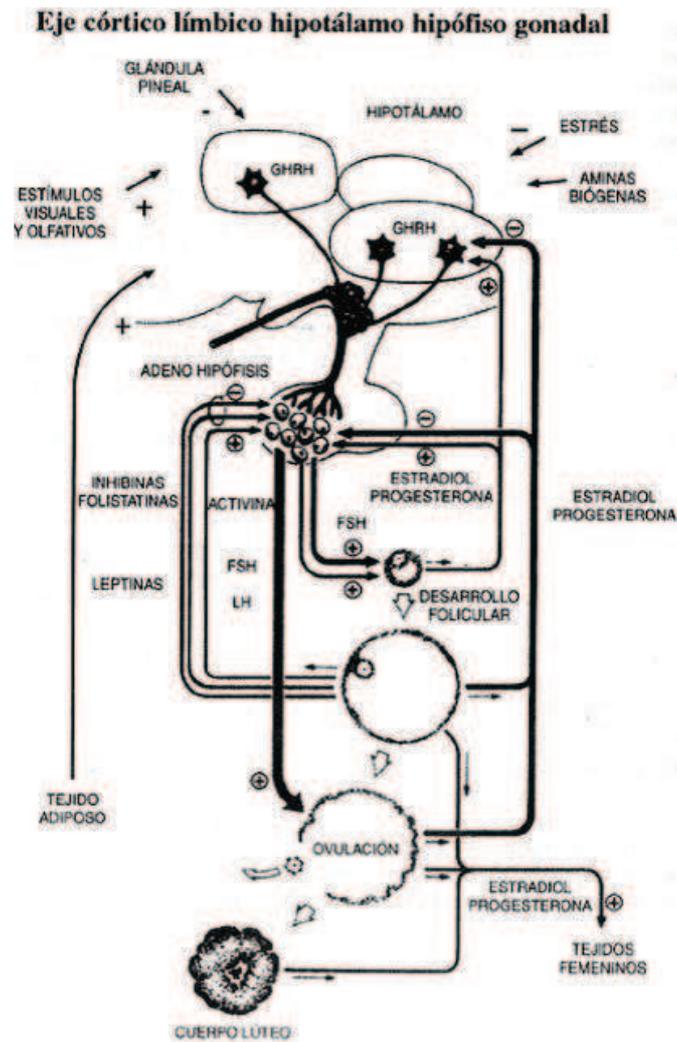


Figura 1 Eje c3rtico l3mbico hipot3lamo hip3fisis gonadal (Lopez, 2004)

El oviducto, el 3tero, el c3rvix y la vagina, respondiendo a la acci3n de las hormonas facilitan el transporte de los ovocitos ovulados, y proveen adem3s un ambiente adecuado para la implantaci3n (en caso de que el ovocito sea fecundado) y el desarrollo del feto.

Ovarios

Las vertebradas desarrollan un par de ovarios. Se ubican a cada lado y contra la pared de la cavidad p3lvica. Est3n sostenidos en su lugar por un mesenterio (mesovario) que se conecta al ligamento ancho uterino. Por el mesovario discurren vasos sangu3neos que se introducen en el ovario a trav3s del hilio. Nervios adren3rgicos y colin3rgicos

entran al ovario también a través del hilio. Aunque el tamaño del ovario varía entre las diferentes especies de mamíferos, la estructura de la gónada es similar. El ovario presenta una médula y una corteza. La médula contiene una rica red vascular en un tejido conjuntivo laxo, vasos linfáticos y nervios; y en la corteza, se localizan los folículos ováricos. La corteza y la médula se continúan de forma imperceptible sin que exista entre ellas una línea clara de demarcación. La capa más externa de la corteza, está formada por un epitelio cilíndrico bajo que inicialmente se denominó epitelio germinal debido a la suposición errónea de que los ovocitos se originaban del mismo. El término ha persistido a pesar de que en la actualidad se sabe que las células germinales primordiales tienen un origen extragonadal. Bajo el epitelio germinal se observa un sector de tejido conjuntivo denso denominado túnica albugínea (Fawcett, 1995). En la corteza se observa un elevado número de folículos (folículo: “pequeña bolsa” en Latín) rodeados de estroma. Un folículo consiste en un ovocito y la pared folicular que lo rodea. Entre el ovocito y la pared folicular existe una fina membrana llamada zona pelúcida. La pared folicular está formada por una capa interna compuesta por células de la granulosa, y una capa externa, formada por células de la teca. La capa de las células de la granulosa está separada de la capa de las células de la teca por la lámina basal. En los folículos maduros, la capa de la teca se divide en teca interna, que contiene células diferenciadas para la producción de esteroides, y teca externa, formada principalmente por tejido conjuntivo. El límite entre la teca interna y la externa no es claro; así como tampoco lo es el límite entre la teca externa y el estroma ovárico. El suministro sanguíneo y nervioso termina en la teca interna. La capa de células de la teca interna contiene capilares, pero estos vasos sanguíneos no atraviesan la lámina basal, por lo que no hay suministro de sangre directo a las células de la granulosa en ninguna de las etapas del crecimiento folicular (foliculogénesis). Todos los nutrientes y el oxígeno requerido por las células que quedan por debajo de la lamina basal, llega a ellas por permeabilidad a través de la lamina basal (Bahr & Humphrey, 1998). (Figura 2)

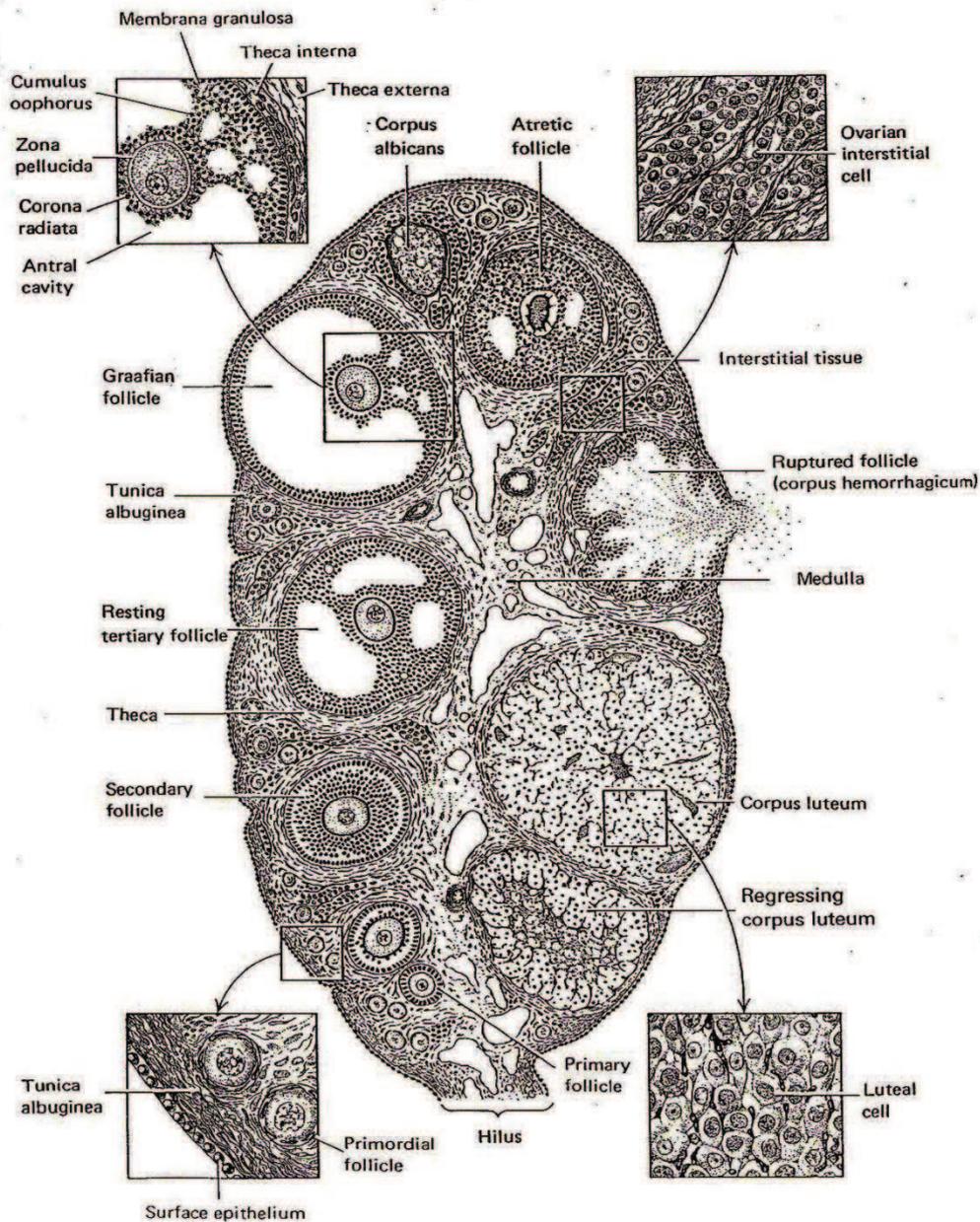


Figura 2 Esquema de ovario (Bahr & Humphrey, 1998 en: Encyclopedia of Reproduction, Ovary overview. Vol. 3, P. 592)

Producción de hormonas – biosíntesis de estrógenos en el ovario

Las gonadotropinas estimulan a las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos antrales maduros para producir hormonas esteroideas actuando directa e indirectamente mediante factores intraovarios.

Las células de la granulosa son las únicas células ováricas que poseen receptores para FSH, mientras que, tanto éstas como las células de la teca interna poseen receptores para la LH. Por un mecanismo mediado por AMP cíclico y a través de receptores en la membrana en la superficie celular, estas células importan lipoproteínas de baja densidad (LDL) que son clivadas para dar colesterol, el precursor principal de la esteroidogénesis. La LH estimula a las células de la teca interna y de la granulosa para la síntesis del androstenediona (un andrógeno débil) a partir del colesterol. En las células de la granulosa, la estimulación por parte de la FSH induce la formación de la enzima P450-aromatasa. Esta enzima cataliza la “aromatización” de la androestenediona a testosterona, que luego por otras vías se transforma en estradiol (E2, estrógeno ovárico predominante).

Las células de la teca interna tienen escasa actividad de la enzima aromatasa. La androestenediona allí sintetizada es captada por las células de la granulosa, donde es procesada por la aromatasa para dar estradiol (Ryan et al, 1968), que se libera a la circulación periférica y a la luz folicular (Teoría de las dos células, Figura 3). El estradiol y la FSH actúan en forma sinérgica aumentando la actividad de la enzima aromatasa y la producción de estradiol (Hsueh et al, 1984). Ambos tipos celulares producen progesterona de manera independiente. (Liu, 1993; Brown, 1998)

Las hormonas esteroideas pueden atravesar las membranas celulares gracias a sus propiedades lipofílicas y unirse a sus receptores intracelulares para desencadenar una cadena de respuestas que terminan en varios tipos de manifestaciones biológicas.

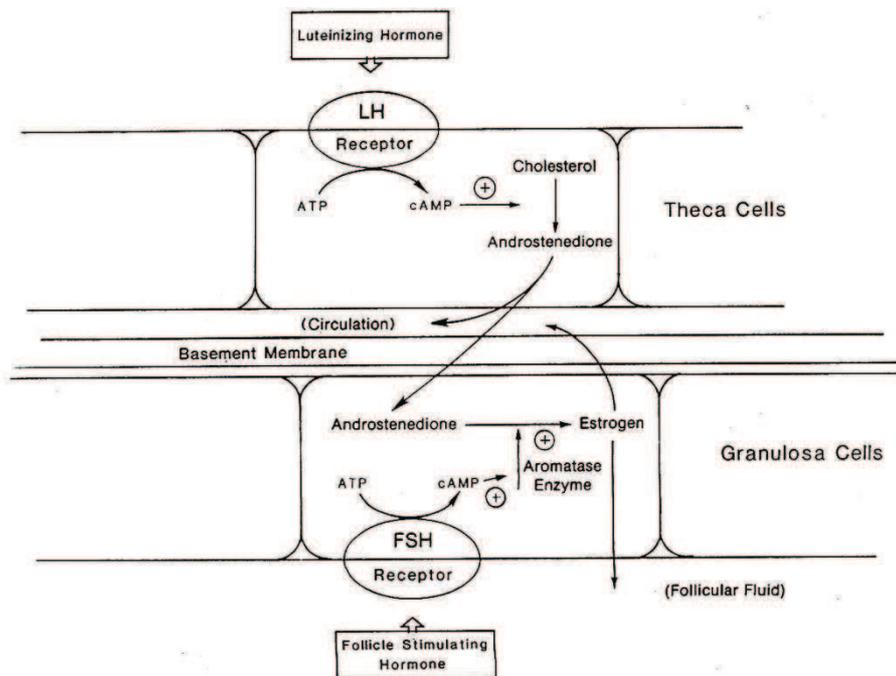


Figura 3 Teoría de la esteroidogénesis folicular: “dos células – dos hormonas”. (Bahr & Humphrey, 1998 en: Encyclopedia of Reproduction, Ovary overview. Vol. 3, P 596)

Mecanismos de acción del estrógeno

Los estrógenos son secretados a la circulación sistémica y cuando alcanzan sus tejidos “blanco”, pueden ejercer su actividad mediada por distintos tipos de receptores intracelulares y de membrana capaces de provocar respuestas lentas (genómicas) que ponen en marcha la actividad transcripcional y respuestas rápidas (no genómicas) mediadas por receptores no bien identificados. (Weihua *et al.*, 2003; Manolagas *et al.*, 2004)

Receptores intracelulares para estrógenos

A partir de tejido uterino, Toft & Gorski (1966) lograron aislar y reconocer la presencia de un receptor de E2 (RE). Estudios subsecuentes demostraron que presentaba una distribución amplia en distintos órganos, y no solamente en aquellos vinculados a la reproducción. Este receptor, actualmente conocido como la variedad alfa (RE α), es expresado en órganos y tejidos tan diversos como el útero, la vagina, las células tecales del ovario (Wang *et al.*, 2000), las células de Leydig del testículo (Tena Sempere *et al.*, 2000), el estroma de la próstata, el epidídimo (Yamashita, *et al.*,

2004), el tejido óseo (Nilsson *et al.*, 2002) , la glándula mamaria (Saji *et al.*, 2000), el miocardio (Ropero *et al.*, 2006), varias regiones del cerebro (Blurton-Jones *et al.*, 1999; Butler *et al.*, 1999) y el tejido adiposo blanco (Pedersen *et al.*, 1991) entre otros.

Posteriormente, se identificó un nuevo tipo de receptor conocido como receptor beta ($RE\beta$) cuya distribución incluye a las células del epitelio de la próstata, células de la granulosa de los folículos ováricos (Kuiper *et al.*, 1996), pulmones, el tejido óseo, la glándula mamaria, el endotelio vascular, el músculo liso, ciertas neuronas del SNC y SNP así como el sistema inmune entre otros (Saunders *et al.*, 1997; Shughrue & Merchenthaler, 2001; Imamov *et al.*, 2005). Originalmente se pensó que ambas variantes del receptor ($RE\alpha$ y β), podían ser obtenidas por procesamiento alternativo de un mismo gen, pero actualmente se sabe que son producto de genes diferentes localizados en distintos cromosomas (Enmark *et al.*, 1997).

Ambos receptores ($RE\alpha$ y β), actúan como factores de transcripción y pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Esta superfamilia incluye a un gran número de factores de transcripción relacionados evolutivamente, y que regulan programas involucrados en un amplio espectro de fenómenos fisiológicos (Chambón, 2005; Germain *et al.*, 2006).

Las funciones mediadas por cada receptor de estrógenos quedan evidenciadas en los animales knock-out (KO). El ratón KO para $RE\alpha$ puso en evidencia la relevancia de este receptor para las funciones reproductivas, ya que son infértiles, con úteros hipoplásicos, ovarios hiperhémicos y sin cuerpos lúteos (Lubahn *et al.*, 1993). Los primeros animales KO desarrollados para $RE\beta$ se caracterizaban por presentar subfertilidad, con disfunción importante de los ovarios e hiperplasia prostática (Krege *et al.*, 1998). Recientemente Antal *et al.* (2008) han producido un nuevo KO para $RE\beta$ dando como resultado ratones de ambos sexos estériles, desconociéndose la causa, ya que el análisis histológico de los órganos reproductivos mostró normalidades.

Ambos receptores presentan varias isoformas, aunque no todas parecen ser funcionales. Estas isoformas podrían modular en forma diferencial la señalización por estrógenos e impactar en la regulación de la expresión de genes blanco (Scobie *et al.*, 2002; Ramsey *et al.*, 2004).

Autoinjerto de ovario

El trasplante de tejido ovárico es una idea antigua que ha sido recientemente el centro de intensas investigaciones (Callejo *et al.*, 2002). Desde hace algunos años se plantea la extracción de tejido ovárico como una herramienta que permita a) estudiar los procesos de foliculogénesis en diversos modelos animales incluyendo al humano, b) estudiar los procesos que llevan a la funcionalidad del injerto y su vida media y c) la restauración de la función ovárica después de quimioterapia en humanos (Torrents *et al.*, 2003).

Se han empleado varios modelos animales para trasplante de tejido ovárico, siendo los más utilizados los roedores (Harp *et al.*, 1994, Cox *et al.*, 1996, Shaw 2000, Liu *et al.*, 2002, Candy *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2002), los ovinos (Gosden *et al.*, 1994; Salle *et al.*, 1998, 1999, Aubard *et al.*, 1999; Baird *et al.*, 1999) y los primates (Schnorr *et al.*, 2002). En la mayoría de los estudios, los animales son sacrificados poco tiempo después de realizado el injerto, y el efecto a largo plazo no ha sido evaluado.

Otros estudios sugieren que aproximadamente el 50% de los folículos primordiales se pierden a consecuencia de isquemia (Nugent *et al.*, 1997; Baird *et al.*, 1999; Gosden *et al.*, 2000). El trabajo experimental de varios investigadores (Callejo *et al.* 2002; von Eye Corleta *et al.*, 1998) ha demostrado que los trasplantes de ovarios de rata adulta, mantienen a corto plazo su secreción hormonal y ejercen su función endocrina en los órganos diana tales como el epitelio de la vagina y el útero. Entonces, la funcionalidad del ovario (ovulación y secreción de hormonas) se mantiene incluso cuando el órgano (por razones de investigación o médicas) es transplantado a otros sitios de la economía (Callejo *et al.*, 2001; Callejo *et al.*, 2002). Sin embargo, antes de que el trasplante de tejido ovárico pueda ser ofrecido a pacientes humanas, la longevidad a largo plazo de los injertos de ovario debe ser determinada. Pocos estudios observan el carácter funcional a largo plazo; y en ellos sólo se considera al ovario como principal elemento de análisis.

Vagina

La vagina es uno de los órganos genitales internos del sistema reproductor femenino, actúa como canal en el transporte de espermatozoides, proporciona una vía de salida y eliminación de los restos menstruales o como canal de salida del producto durante el parto.

Es una estructura tubular fibromuscular que se extiende desde el vestíbulo de los genitales externos femeninos hasta el cerviz uterino.

En un corte transversal de la pared de la vagina se pueden distinguir tres capas: la mucosa, la muscular y la adventicia. (Fawcett, 1995; Welsch, 2008) (Figura 4)

La mucosa está formada por un epitelio y la lámina propia que lo subyace (tejido conjuntivo). El epitelio es estratificado plano no queratinizado, formado principalmente por cuatro capas celulares: la capa basal, la capa parabasal, la capa intermedia y la capa superficial (Forsberg, 1995). En la mujer, el tamaño de las células de la superficie varía con la edad, siendo más grandes en la juventud y más pequeñas en la adultez. La lámina propia está formada por tejido conjuntivo denso con fibras elásticas y una vasta red de vasos sanguíneos. La lámina propia se vuelve menos densa a medida que se aproxima a la capa muscular. La notable elasticidad de la vagina está relacionada con el gran número de fibras elásticas que se observan en el tejido conjuntivo de su pared y su extenso plexo venoso. La capa muscular está formada por haces de fibras musculares lisas que se disponen en una capa circular interna y una capa longitudinal externa. Se observan además fibras de músculo esquelético formando un esfínter en la abertura de la vagina. La túnica adventicia es una capa delgada de tejido conjuntivo rica en fibras elásticas. Los haces de fibras nerviosas cruzan la adventicia para alcanzar la capa muscular y la mucosa (Papka & Williams, 1998).

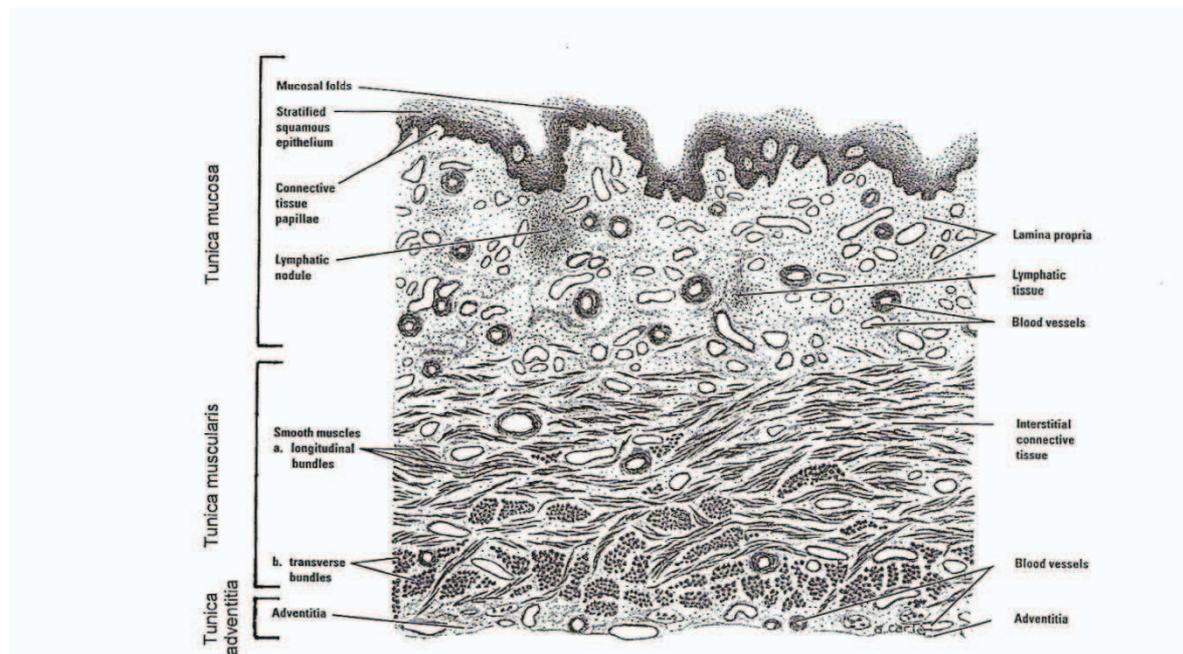


Figura 4 Corte longitudinal de vagina (Papka & Williams, 1998 en: Encyclopedia of Reproduction, Vagina. Vol. 4 P 964)

Ciclo del epitelio vaginal

El epitelio de la vagina presenta modificaciones con las fluctuaciones hormonales del ciclo hormonal ovárico (Papka & Williams, 1998). En la rata el cambio del epitelio vaginal a lo largo del ciclo estral se puede determinar mediante la toma de frotis vaginales que posteriormente se observan al microscopio para identificar según su citología. En el proestro en la vagina se produce un engrosamiento epitelial y en el frotis: se observan abundantes células epiteliales, muy pocos leucocitos y muy escasas células cornificadas. Durante el estro, se advierte una mayor cantidad de células cornificadas y muy pocas células epiteliales. Hacia el metaestro ó diestro 1, se inicia la regresión del epitelio vaginal y las células cornificadas se degeneran. Finalmente en el diestro 2 hay abundantes leucocitos y muy escasas células epiteliales. (Figura 5)

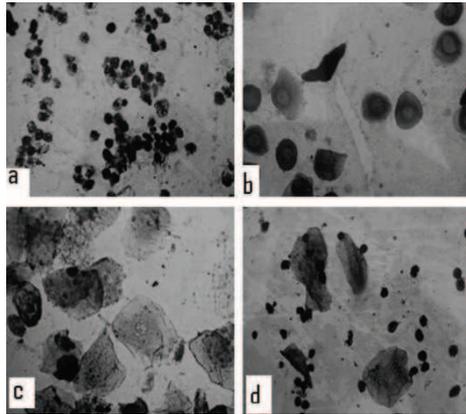


Figura 5 Frotis vaginal de rata que muestra las diferentes fases del ciclo estral (Shrestha *et al.*, 2010)

(a) Diestro 2, (b) Proestro, (c) Estro, (d) Metaestro o Diestro 1

En la mujer, y de manera semejante a lo que ocurre en los roedores, se observa que durante la fase folicular, las células de la superficie del epitelio se vuelven grandes y planas, el núcleo se vuelve picnótico, el citoplasma muestra elevada acidofilia y el glucógeno se acumula en el citoplasma. Hacia la mitad del ciclo, la estimulación de los estrógenos maximiza el grosor del epitelio y la acumulación de glucógeno. Durante la fase luteal, disminuye el grosor epitelial debido a la descamación de las células de la superficie. Las células descamadas son de forma irregular. En esta etapa, el glucógeno es menos abundante en las células. (Papka & Williams, 1998)

Receptores de estrógeno en la vagina

Las primeras señales significativas de ARNm de RE α en el tracto reproductivo de la rata hembra se detectan hacia el día 14 de vida fetal, en las células mesenquimáticas de los conductos de Muller. Dichos conductos darán origen a varias regiones del tracto reproductivo de la hembra (oviducto, útero, cérvix y la porción superior de la vagina). Hacia el día 17 de vida intrauterina, se detecta señal de ARNm de RE α en los precursores de las células epiteliales del oviducto, pero no se observa en el epitelio de otras porciones del tracto reproductivo. En el mesénquima del cérvix y la vagina, se detectan señales intensas de ARNm de RE α hacia los días 18–19, mientras que no se evidencia señal de ARNm de RE α en el epitelio sino hasta los días 4-6 de vida post natal. A partir de ese momento, la señal más fuerte y distintiva de ARNm de RE α a

nivel de la vagina se localiza en la capa basal del epitelio y la intensidad disminuye hacia la luz del órgano.

Respecto al RE β , no se observa señal de su ARNm en el tracto reproductivo de la hembra durante el período prenatal, y ésta se detecta de manera débil en el período postnatal. (Mowa & Iwanaga, 2000a)

En ratas adultas, el análisis de hibridación in situ de los ARNm de RE en el tracto reproductivo muestra una densa señal de RE α en células epiteliales y del estroma desde el oviducto hasta la vagina, mientras que en la capa muscular existen señales moderadas. A nivel del ovario se observa acumulación moderada de señales de ARNm de RE α . En cambio, la expresión de ARNm de RE β es moderada o débil desde el oviducto hasta la vagina. La señal de RE β es escasa y sólo se detecta en la capa muscular del oviducto. Por el contrario, se detecta intensa señal en el ovario.

La intensidad de la señal de los subtipos de RE estudiados, parece no sufrir variación significativa en ninguna región del tracto reproductivo a lo largo del ciclo estral (Mowa & Iwanaga, 2000b).

En las mujeres, los receptores de estrógeno se expresan tanto en las células epiteliales como en las células del estroma del útero y de la vagina. En el epitelio estratificado de la vagina, existen RE nucleares en la capa basal, parabasal y capas intermedias, pero no se observan en las células de la superficie. La expresión a nivel del epitelio varía a lo largo del ciclo menstrual, siendo mayor durante la fase folicular. Sin embargo, esta variación no es tan prominente como la que se observa en el endometrio (útero). En los núcleos de las células del músculo liso de la capa muscular también hay receptores de estrógenos, y la expresión de estos no varía según la etapa del ciclo menstrual. (Press *et al.*, 1986)

OBJETIVO

Estudiar los efectos del autoinjerto de ovario colocado en tejido celular subcutáneo en ratas prepúberes o adultas sobre la morfohistología de la vagina a diferentes lapsos postoperatorios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se emplearon ratas Wistar hembra de 20 días y de 3, 6, 9 ó 12 meses de edad. Los animales fueron obtenidos de la Unidad de reactivos Biológicos para Experimentación (URBE) de Facultad de Medicina de la Universidad de la República. Todos los procedimientos quirúrgicos y de uso de animales se realizaron siguiendo la ordenanza de Uso de Animales de Laboratorio de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de luz (05:00 a 19:00 hrs) y de alimentación y agua *ad libitum*.

Toma de frotis vaginales

En los animales adultos se realizó el seguimiento de ciclo estral mediante la toma de frotis vaginales durante 15 días previos a intervención quirúrgica o al día de la autopsia.

Procedimientos quirúrgicos

Los animales fueron sometidos a procedimiento quirúrgico (Chávez & Dominguez, 1994) o autopsia en el día del Estro vaginal observado. Los autoinjertos de ovario y la toma de muestras biológicas se realizaron bajo anestesia farmacológica, utilizando una mezcla de Xilazina (HCl 10%, 5mg/Kg Vetcross Industria Uruguay) con Ketamina (90mg/Kg Vetanarcol Lab. Konning).

Grupos experimentales

El autoinjerto de ovario se realizó en animales de 20 días ó de 3 ó 9 meses de edad. Los animales fueron sacrificados 3 u 8 meses post injerto. Grupos de animales de edades similares sin ninguna manipulación quirúrgica fueron utilizados como grupos control.

Los grupos formados y el número de animales utilizado se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Grupos de animales

Grupo	n	Edad	Periodo post injerto	Siglas
Control	4	4 meses		C4m
	4	7 meses		C7m
	4	9 meses		C9m
	4	12 meses		C12m
Autoinjerto	8	20 días	3 meses	AI 20d 3m
	8	20 días	8 meses	AI 20d 8m
	8	3 meses	3 meses	AI 3m 3m
	8	3 meses	8 meses	AI 3m 8m
	8	9 meses	3 meses	AI 9m 3m

Obtención de muestras biológicas

Suero

Los animales bajo anestesia profunda, se colocaron en posición decúbito dorsal y con la ayuda de tijeras se disecó a la rata por la línea media ventral. Se separó la piel y el músculo para exponer la cavidad abdominal. Se identificó el músculo diafragmático y se lo cortó, lo mismo que las costillas, para dejar al descubierto la cavidad torácica. Se puncionó el ventrículo cardíaco con aguja y jeringa para extraer sangre. La sangre se mantuvo a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo, acto seguido se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. El plasma fue separado del coagulo por aspiración, separada en tubos eppendorf, etiquetada y guardada a -20 C hasta la medición de hormonas esteroideas.

Disección de órganos

En la cavidad abdominal previamente expuesta, se retiraron las vísceras y se localizó la vejiga. Inmediatamente por detrás de ésta, se localizaron ambos cuernos del útero y la vagina. Se retiró todo el tracto reproductivo del cuerpo del animal y se eliminó el tejido adiposo con la ayuda de tijeras. Luego, las muestras se colocaron en fijador

(paraformaldehído 4%) durante 24 horas, para después ser colocadas en alcohol 70 hasta su procesamiento histológico. (Anexo I)

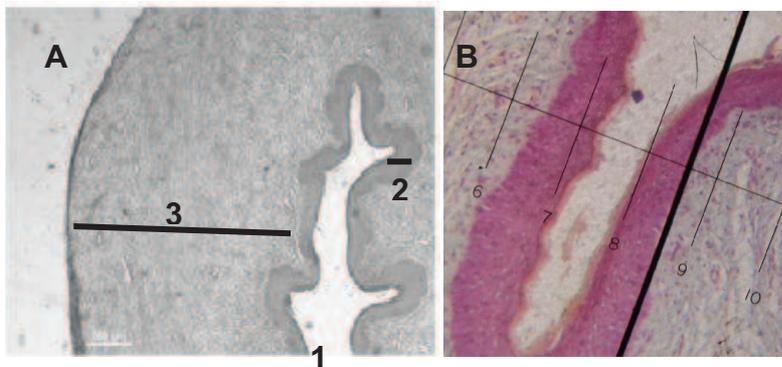
Procesamiento histológico

Las vaginas de los diferentes grupos fueron incluidas en parafina y cortadas con micrótopo. Se obtuvieron cortes de 8 μm de espesor del sector medio de la vagina que fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina (H y E). (Anexo I)

Estudio morfométrico: Medición de epitelio y capa muscular en cortes transversales de vagina

Los cortes fueron observados al microscopio óptico (10x y 40x). Con la ayuda de un ocular micrométrico colocado en una de los lentes oculares, se midió el grosor entre la luz del órgano y el límite del epitelio ó entre la luz del órgano hasta el fin de la capa muscular. (Figura 6 A y B) En los casos en que el epitelio presentó invaginaciones, se tomó la medida tanto del grosor más bajo como del más alto, obteniendo una medida promedio. Se estudiaron 4 cortes por vagina y 5 medidas por corte.

Figura 6 Cortes de vagina. Se muestra la reglilla del ocular micrométrico para medición del grosor del epitelio y capa muscular.



A (4x) 1) Luz del órgano, 2) Epitelio, 3) Capa muscular.
B (40x) Aumento del epitelio vaginal

Inmunohistoquímica para RE α

Las cortes fueron desparafinados con xilol y rehidratados con baños de etanol en concentraciones decrecientes. Después del baño en alcohol 70, los cortes fueron colocados en 0.5% de H₂O₂ en PBS por 20 minutos para eliminar la actividad de peroxidasa endógena. A continuación se aplicó una técnica del reavivado antigénico en microondas usando buffer citrato 10Mm pH= 6 por 40 minutos en baño maría. Luego de dejar enfriar los preparados hasta la temperatura ambiente, se bloquearon las uniones no-específicas. Primero, se utilizó una solución de bloqueo (Goat serum, Zymed Lab) por 30 minutos; y luego, una segunda solución de bloqueo (PBS + tritón 0.5% + 2% albúmina (BSA) por otros 30 min. Los cortes ya bloqueados se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con anticuerpo anti –RE α (Laboratorio Santacruz RE α MC20, SC 542) en una proporción de 1:200. Al día siguiente y después lavar con PBS, los cortes fueron incubados con anticuerpo secundario (Donkey Anti-rabbit Ig biotinylate, Laboratorio Amersham farmacia Biotech.) en una proporción 1:300 durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavar con PBS el anticuerpo secundario, se incuban las muestras con complejo avidina-biotina (ABC kit Vectastain, Vector Laboratorios Inc.) por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente para el revelado, se utilizó la diaminobenzidina (DAB Kit, Vector Laboratories Inc) como el cromógeno para visualizar el complejo avidino-biotina bajo observación al microscopio óptico (Anexo II).

Evaluación del inmunomarcado en epitelio vaginal

La inmunoreactividad se limitó a los núcleos de las células, lugar de marcado por el anticuerpo utilizado. De cada grupo de animales se contaron 300 núcleos de células basales del epitelio de la vagina y se las clasificó como negativas, débilmente positivas o positivas, tras la observación de los preparados en microscopio óptico a un aumento de 100x.

Adquisición de imágenes

Para el registro de las imágenes, los portaobjetos fueron colocados en el microscopio óptico y se tomaron fotografías a 10x y 40x usando una cámara digital (Nikon digital

slight) incorporada al microscopio (Nikon). Las imágenes fueron importadas a una computadora y allí procesadas.

Medición de Estrógenos y Testosterona

Las muestras de plasma/suero se determinaron en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Las concentraciones de Testosterona fueron determinadas por un radioinmunoensayo (RIA) en fase sólida utilizando kits de DPC (Diagnostic Product Co., Los Angeles, CA, USA). Todas las muestras fueron analizadas en duplicado en el mismo ensayo. La concentración mínima detectable del ensayo fue de 14.9 ng/dL. Los coeficientes de variación intraensayo para controles bajos (21.6 ng/dL), medios (106 ng/dL) y altos (401 ng/dL) fueron 9.8 %, 11 % y 17 %, respectivamente. El estradiol 17 β se determinó por RIA en fase sólida utilizando kits de DPC. Todas las muestras fueron analizadas en duplicado el mismo ensayo. La concentración mínima detectable del ensayo fue de 11.7 pg/ml. Los coeficientes de variación intraensayo para controles bajos (19 pg/ml), medios (139 pg/ml) y altos (512 pg/ml) fueron 31 %, 12% y 14 % respectivamente.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm error estándar medio de cada grupo de animales para 1) área total, 2) área del epitelio y 3) área de la capa muscular de la vagina. Las comparaciones entre grupos control y tratados y sus diferencias estadísticas fueron calculados mediante la prueba de "t" de Student.

RESULTADOS

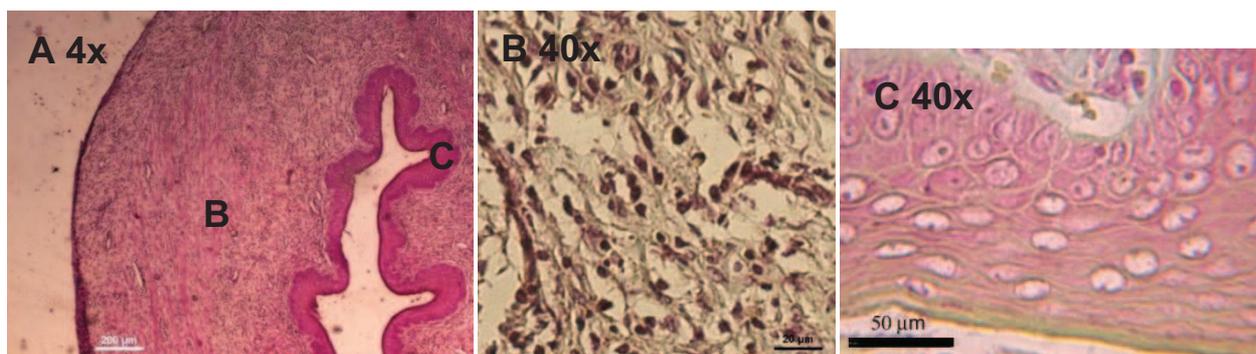
ANIMALES CONTROL

Morfohistología de la vagina

En todos los grupos control se observó una apariencia histológica normal de la vagina: luz del órgano, epitelio estratificado plano y capa muscular con una rica trama vascular (Figura 7A) y alta infiltración de eosinófilos en el conjuntivo. (Figura 7B).

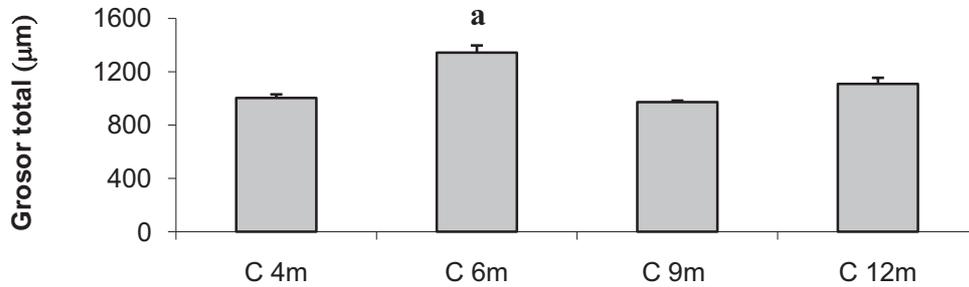
La capa basal del epitelio mostró una gran densidad de células orientadas de forma vertical y con núcleo basal redondo u oval intensamente coloreado. En la zona intermedia, se observaron células grandes y con núcleos redondos y coloración menos intensa que los núcleos de las células de la capa basal. La capa superficial se observó formada por células cuyos núcleos eran de forma aplanada y orientación horizontal (Figura 7C). En la capa muscular bien definida se observaron fibras de músculo liso dispuestas de forma circular y longitudinal. Las fibras musculares se disponían muy juntas en “paquetes”, separados unos de otros por un fina capa de tejido conjuntivo.

Figura 7 Corte (transversal) de la pared de vagina de rata adulta control a diferentes aumentos



El estudio morfohistológico de la vagina control permitió observar que el grosor total de la pared de la vagina presentó su mayor diámetro a los 6 meses de edad. (Gráfica 1)

Gráfica 1 Media \pm e.e.m. del grosor **total** (epitelio+músculo: μm) de la pared de la vagina de ratas control a 4, 6, 9 y 12 meses de edad



(a) $P \leq 0.05$ vs. C4m, C9m, C12m

En los animales control de 4 meses de edad el epitelio estratificado plano estuvo formado aproximadamente entre 10 y 12 capas de células, en las otras edades estudiadas el rango de capas contado fue semejante, pero el rango de variabilidad fue mayor (C6m: 5 a 12; C9m: 7 a 12; y C12m: 6 a 10). El grosor del epitelio se observó disminuido hacia los 12 meses de edad. La capa muscular mostró variaciones con la edad siendo el menor grosor a los 9 meses y el máximo a los 6 meses. (Tabla 2, Figura 8).

Tabla 2 Media \pm e.e.m. del grosor (μm) del epitelio y de la capa muscular de vaginas de rata control a 4, 6, 9 y 12 meses de edad

GRUPO	EPITELIO	MUSCULO
C 4m	99,77 \pm 5,36	903,39 \pm 27,48
C 6m	96,50 \pm 6,78	1245,92 \pm 55,12 c d
C 9m	146,70 \pm 5,50 a	825,52 \pm 13,60
C12m	52,85 \pm 4,16 b	1055,37 \pm 46,11

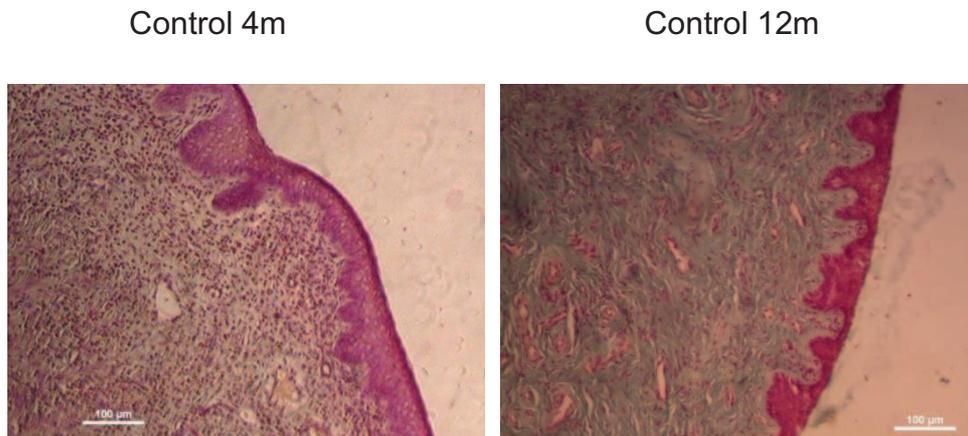
(a) $P \leq 0.05$ vs. C4m, C6m, C12m

(b) $P \leq 0.05$ vs. C4m, C9m, C12m

(c) $P \leq 0.05$ vs. C4m

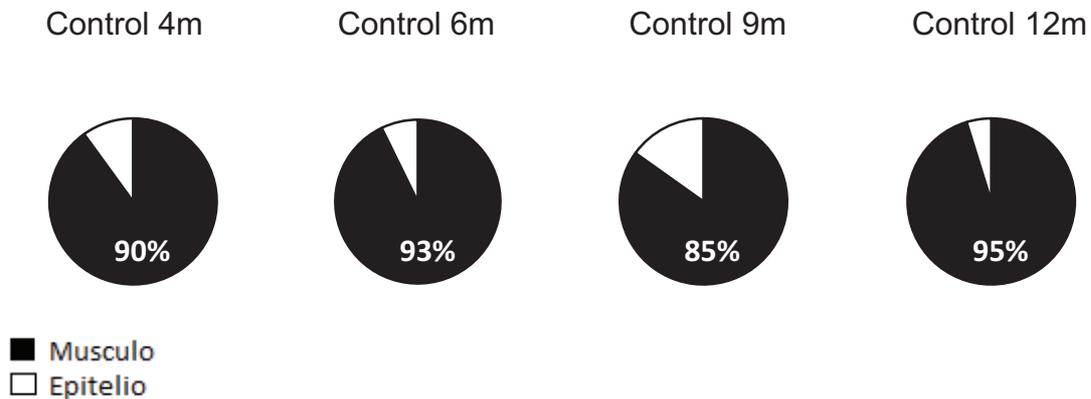
(d) $P \leq 0.05$ vs. C9m, C12m

Figura 8 Corte (transversal) de la vagina de ratas control de 4 y 12 meses de edad (10x)



La relación entre epitelio y músculo, expresado en porcentaje se representa en la Gráfica 2. Como puede observarse, hacia los 12 meses de edad la capa muscular presenta el mayor porcentaje de esta relación.

Gráfica 2 Porcentaje el epitelio ó la capa muscular respecto del grosor total de la vagina de animales control de 4, 6, 9 y 12 meses de edad.



Inmunohistoquímica para RE α

La inmunohistoquímica para RE α mostró la presencia de células con núcleo intensamente coloreado, con marcación débil ó sin marca. En las ratas control de 4 y 9 meses aproximadamente el 70% de las células contadas presentaron núcleos

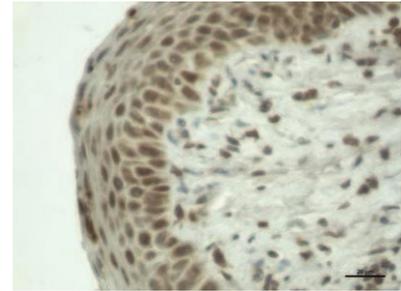
marcados en forma positiva. En los animales control de 6 y 12 meses, este tipo de célula alcanzó alrededor del 50%. (Tabla 3, Figura 9)

Tabla 3 Porcentaje de células inmunoreactivas para RE α en cortes histológicos de vaginas de ratas control de 4, 6, 9 y 12 meses de edad.

GRUPO	CÉLULAS (%)		
	Negativas	Débilmente positivas	Positivas
C4m	13,70	16,30	70,00
C6m	22,00	25,50	52,50 a
C9m	2,00	21,60	76,40
C12m	22,50	24,70	52,80 a

(a) P<0.001 vs C4m, C9m

Figura 9 Inmunohistoquímica para RE α en corte histológico de vagina de animal control (40x)



Concentraciones plasmáticas de estradiol y testosterona

En los animales control de 4,6 y 9 meses de edad no se observaron diferencias en las concentraciones plasmáticas de estradiol. La concentración del estradiol disminuyó en el grupo de 12 meses de edad, con aumento significativo de concentración plasmática de testosterona (Tabla 4).

Tabla 4 Concentraciones plasmáticas de estradiol (pg/dl) y testosterona (ng/ml) en ratas control de 4, 6, 9 y 12 meses de edad

GRUPO	ESTRADIOL (pg/ml)	TESTOSTERONA (ng/dl)
C4m	38,47 ± 2,97	0,98 ± 0,56
C6m	46,26 ± 3,61	1,45 ± 0,71
C9m	48,08 ± 4,30	1,48 ± 0,56
C12m	24,83 ± 2,02 a	11,95 ± 2,96 a

(a) P≤ 0.05 vs C4m, C6m, C9m

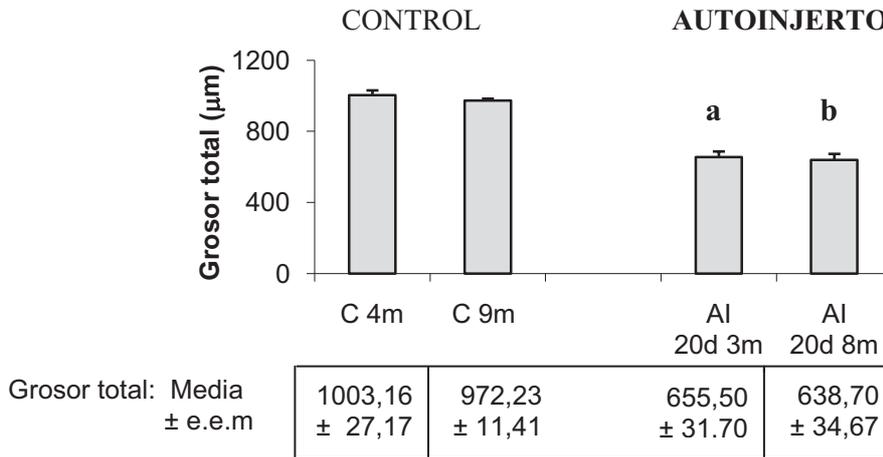
ANIMALES CON AUTOINJERTO DE OVARIO

Ratas injertadas en período prepúber

Morfohistología de la vagina

El grosor total de la pared vaginal de animales injertados en la edad prepúber y sacrificados 3 (AI 20d3m) ú 8 (AI 20d8m) meses post-injerto, fue menor que la observada en animales control de edades correspondientes. (Gráfica 3)

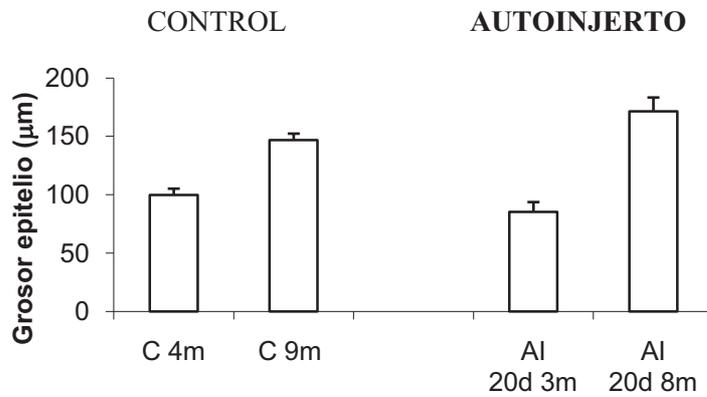
Gráfica 3 Media \pm e.e.m. del grosor (μm) total de la pared vaginal de ratas injertadas a los 20 días de edad y sacrificadas 3 u 8 meses post injerto y sus controles correspondientes



(a) $P < 0.05$ vs. C 4m, (b) $P < 0.05$ vs. C 9m

El grosor del epitelio vaginal de éstos grupos no mostró diferencias significativas respecto a controles de edad correspondiente. (Gráfica 4)

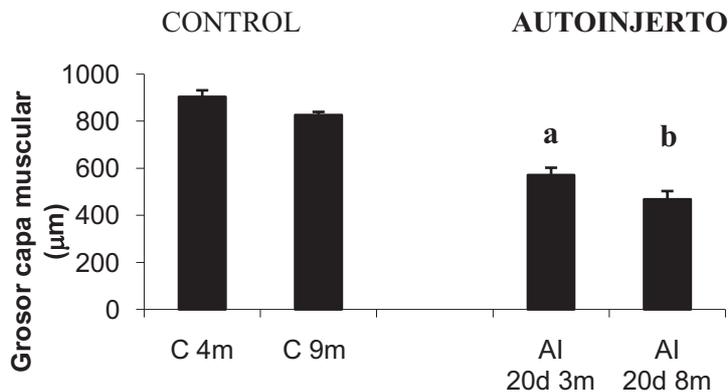
Gráfica 4 Media \pm e.e.m. del grosor (μm) del **epitelio** vaginal de ratas injertadas a los 20 días de edad y sacrificadas 3 u 8 meses post injerto y sus controles correspondientes



Grosor epitelio: Media \pm e.e.m	99,77 \pm 5,36	146,70 \pm 5,50	85,25 \pm 8,30	171,51 \pm 11,64
------------------------------------	------------------	-------------------	------------------	--------------------

El grosor de la capa muscular; presentó disminución significativa respecto a controles de edad. (Gráfica 5)

Gráfica 5 Media \pm e.e.m. del grosor (μm) de la **capa muscular** de la vagina de ratas injertadas a los 20 días de edad y sacrificadas 3 u 8 meses post injerto y sus controles correspondientes



Grosor músculo: Media \pm e.e.m	903,39 \pm 27,48	825,52 \pm 13,60	570,25 \pm 31,80	467,20 \pm 35,71
-----------------------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------

(a) $P < 0.05$ vs. C 4m, (b) $P < 0.05$ vs. C 9m

El porcentaje que representa el epitelio o la capa muscular respecto del grosor total de la vagina de animales injertados en edad prepúber se representa en la Gráfica 6.

Gráfica 6 Relación entre el epitelio y la capa muscular respecto del grosor total de la vagina de animales injertados a los 20 días de edad con distintos períodos de evolución (en porcentaje).



Inmunohistoquímica para RE α

La inmunohistoquímica para RE α 3 u 8 meses después de realizado el autoinjerto, mostró al igual que en los animales control, la presencia de células con núcleo intensamente coloreado, con marcación débil ó sin marca. Aproximadamente el 75% de las células contadas en los animales injertados presentaron núcleos marcados en forma positiva, sin mostrar diferencias significativas con los controles correspondientes. (Tabla 5)

Tabla 5 Inmunohistoquímica RE α en cortes de vaginas de ratas injertadas a los 20 días de edad y sacrificadas 3 u 8 meses post injerto.

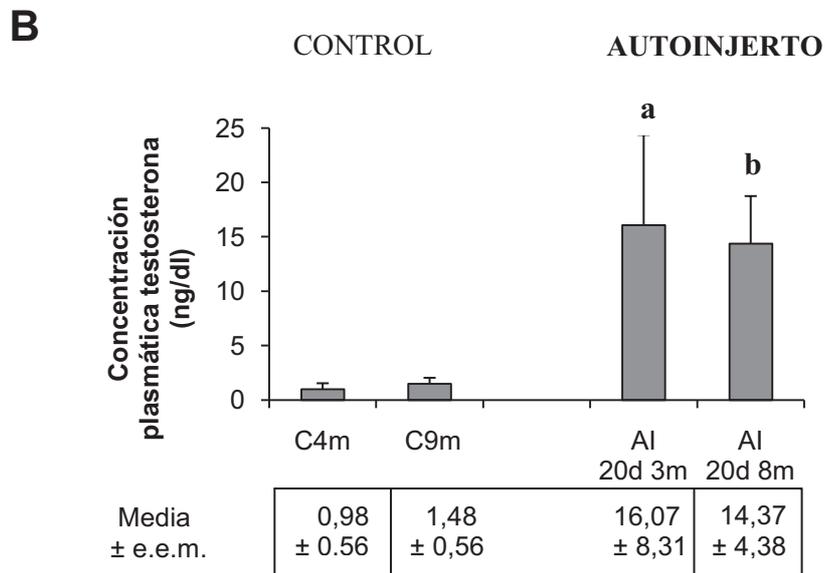
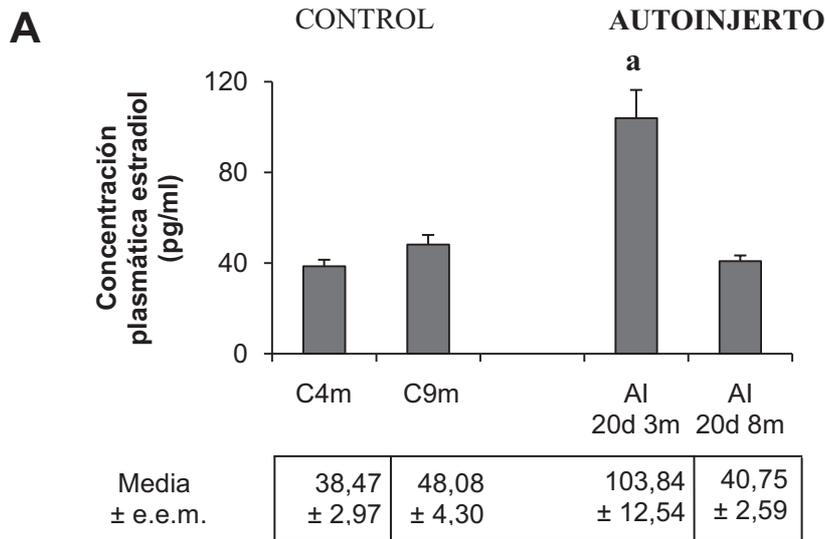
GRUPO	CÉLULAS (%)		
	Negativas	Débilmente positivas	Positivas
AI 20d 3m	4,00	22,00	74,00
AI 20d 8m	6,00	18,00	76,00

Concentraciones plasmáticas de estradiol y testosterona

Las concentraciones plasmáticas de estradiol para el grupo AI 20d 3m fue significativamente mayor respecto al control de edad correspondiente (Gráfica 7A). La concentración plasmática de testosterona aumentó de manera significativa en los

animales injertados en la etapa prepúber (AI 20d 3m y AI 20d 8m) respecto de los controles correspondientes. (Gráfica 7B)

Gráfica 7 Media \pm e.e.m. de la concentración plasmática de **(A) Estradiol** (pg/ml) o de **(B) Testosterona** (ng/dl) en ratas injertadas a los 20 días de edad, sacrificadas 3 u 8 meses post injerto, y sus controles correspondientes



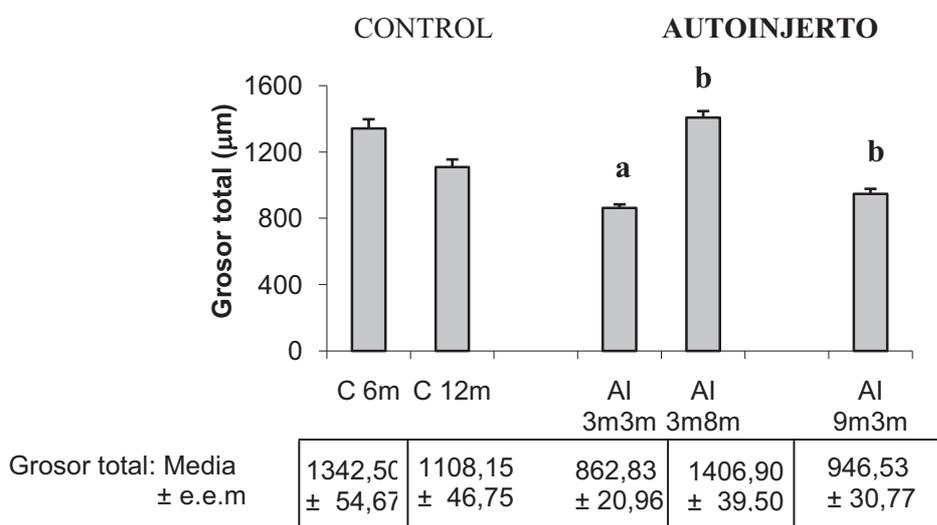
(a) $P < 0.05$ vs. C 4m, (b) $P < 0.05$ vs. C 9m

Ratas injertadas en período adulto

Morfohistología de la vagina

El grosor de la pared de la vagina de animales adultos sacrificados tres meses post injerto fue estadísticamente menor que el observado en animales control de edades semejantes. A mayor tiempo post injerto el grosor de la pared vaginal presentó hipertrofia. En el grupo de animales AI 9m3m, el grosor de la pared vaginal fue menor que la del grupo control de 12 meses de edad. (Gráfica 8)

Gráfica 8 Media \pm e.e.m. del grosor (μm) total de la pared vaginal de ratas injertadas a los 3 o 9 meses de edad y sacrificadas 3 u 8 meses post injerto y sus controles correspondientes.

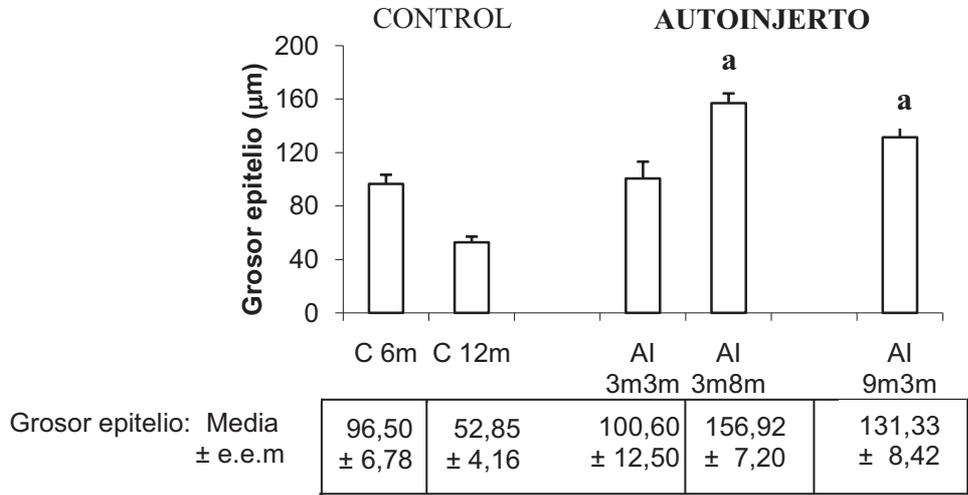


(a) $P < 0.05$ vs. C6m, (b) $P < 0.05$ vs. C12m

Al analizar si los cambios en el grosor de la pared vaginal estuvieron relacionados a cambios en el epitelio o capa muscular, se observó que el injerto con plazo corto de evolución AI 3m 3m no mostró diferencias significativas en el grosor del epitelio vaginal respecto del grupo control correspondiente; mientras que el grupo con 8 meses de evolución se observó un aumento del grosor. (Gráfica 9)

En los animales del grupo AI 9m 3m el grosor del epitelio vaginal aumentó de manera significativa.

Gráfica 9 Media \pm e.e.m. del grosor (μm) del **epitelio** de la vagina de ratas injertadas a los 3 o 9 meses de edad y sacrificadas 3 u 8 meses post injerto y sus controles correspondientes

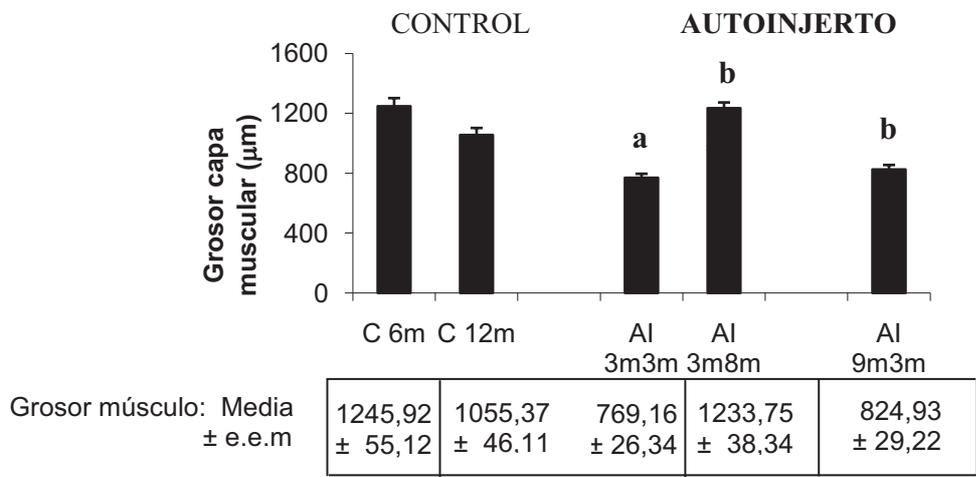


(a) $P < 0.05$ vs. C12m

El grosor de la capa muscular de animales adultos con AI de corta evolución post injerto (3m), presentó una disminución significativa respecto de los controles correspondientes.

Por el contrario, en los animales con largo período post injerto, se evidenció un aumento de esta capa respecto a los animales control. (Gráfica 10)

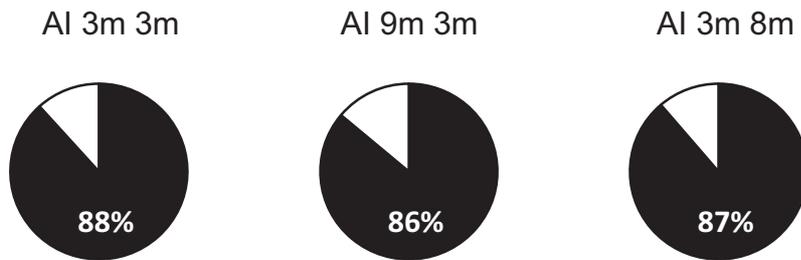
Gráfica 10 Media \pm e.e.m. del grosor (μm) de la **capa muscular** de la vagina de ratas injertadas a los 3 o 9 meses de edad y sacrificadas 3 u 8 meses post injerto y sus controles correspondientes



(a) $P < 0.05$ vs. C6m (b) $P < 0.05$ vs. C12m

El porcentaje que representa el epitelio ó la capa muscular respecto al grosor total de la vagina de ratas adultas con autoinjerto de ovario se representa en la Gráfica 11.

Gráfica 11 Porcentaje que representa el epitelio ó la capa muscular respecto del grosor total de la vagina de animales injertados a los 3 o 9 meses de edad con distintos períodos de evolución



Inmunohistoquímica para REα

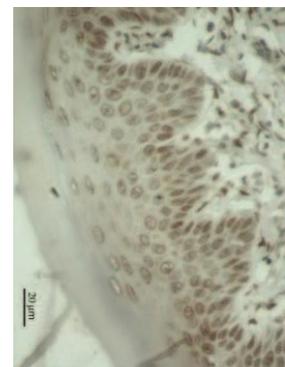
La inmunohistoquímica para REα 3 u 8 mostró la presencia de células con núcleo intensamente coloreado, con marcación débil ó sin marca. (Figura 10)

En los animales injertados a los 3 meses de edad, el número de células intensamente teñidas alcanzó aproximadamente el 90% luego de 3 meses de realizado el injerto, o el 60% luego de 8 meses post injerto. En las ratas autoinjertadas a los 9 meses de edad, el número de células positivas fue aproximado al 60%. (Tabla 6).

Tabla 6 Inmunohistoquímica REα en cortes histológicos de vaginas de ratas injertadas a los 3 o 9 meses de edad y sacrificadas 3 u 8 meses post injerto

GRUPO	CÉLULAS (%)		
	Negativas	Débilmente positivas	Positivas
AI 3m 3m	3,00	10,00	87,00 a
AI 3m 8m	7,00	30,00	63,00 b
AI 9m 3m	16,50	25,00	58,50

Figura 10 Inmunohistoquímica para REα en corte histológico de vagina de rata injertada (40x)



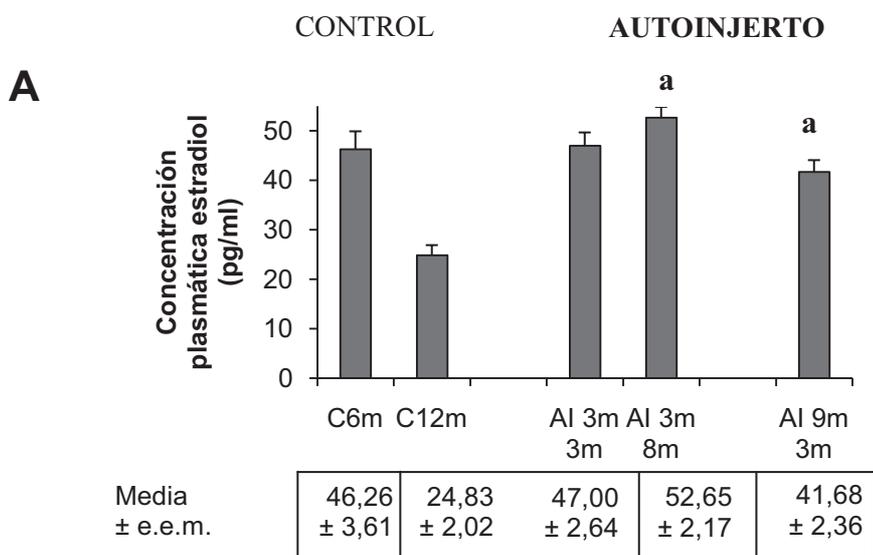
(a) $P < 0.001$ vs C6m (b) $P = 0.031$ vs C12m

Concentraciones hormonales de estradiol y testosterona

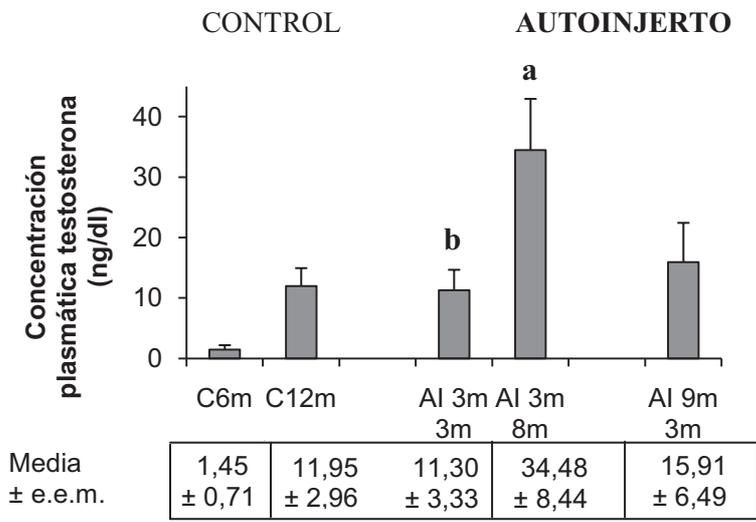
En el caso del injerto realizado a los tres meses de edad, y luego de 3 meses postinjerto, la concentración plasmática de estradiol fue significativamente semejante al control. Sin embargo, tras un largo período luego del procedimiento (8 meses), el valor de estradiol en plasma se encontró aumentado (Gráfica 12A). Las concentraciones plasmáticas de testosterona aumentaron de manera significativa en los animales de los grupos de corta y larga (AI 3m 3m o AI 3m 8m) evolución post injerto, respecto de los controles correspondientes (Gráfica 12B).

En el grupo de animales injertados a los nueve meses de edad, se evidenció variación en los niveles de estradiol (Gráfica 12A), pero no en los de testosterona respecto al control (C12m) (Gráfica 12B).

Gráfica 12 Media \pm e.e.m. de la concentración plasmática de **(A) Estradiol** (pg/ml) o de **(B) Testosterona** (ng/dl) en ratas injertadas a los 3 o 9 meses de edad, sacrificadas 3 u 8 meses post injerto, y sus controles correspondientes



B



(a) $P < 0.05$ vs C12m (b) $P < 0.05$ vs C6m

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que la vagina, órgano blanco de las hormonas ováricas, presenta cambios morfohistológicos significativos en respuesta a las hormonas sexuales esteroideas secretadas por el autoinjerto de ovario, que dependen tanto de la edad del individuo injertado, como del tiempo de acción del injerto.

Diferentes respuestas tróficas a los estrógenos, progestinas y andrógenos en los diferentes tipos celulares de las capas de la pared de la vagina han sido reportadas (Papka & Williams, 1998; Pessina *et al.*, 2006a), sin embargo, aún no se conocen completamente los mecanismos involucrados en estos cambios (Pessina *et al.*, 2006a).

Nuestros datos muestran que las capas de la pared vaginal (mucosa y músculo) presentaron variaciones morfofuncionales que correspondieron al ambiente endócrino del individuo en estudio. Diversos autores señalan a los estrógenos en particular, como el responsable de la funcionalidad del epitelio vaginal (Lindzey & Korach, 1998).

En los animales control, el máximo grosor del epitelio se evidenció a los 10 meses de edad y el menor a los 12, cambios que fueron acompañados por variaciones en el porcentaje de células inmunopositivas para REalfa y de la concentración de estrógenos. Dichas edades correspondieron a etapas en las que la ciclicidad vaginal comenzaba a perderse y la concentración plasmática de 17 beta estradiol declinaba, alteraciones que han sido consideradas como indicadoras de finalización de la edad fértil (vom Saal *et al.*, 1994).

En los animales injertados, la morfohistología general de la pared vaginal (mucosa+músculo) fue semejante a los animales control. Sin embargo, el tamaño de la vagina fue mucho menor cuando el injerto de ovario se realizó en la etapa prepuberal. Dado que los animales injertados no presentaron cambios en el tamaño o peso corporal respecto los animales control (datos no mostrados), es posible deslindar cambios referidos al crecimiento corporal. La reducción del tamaño de la vagina estuvo referida a una disminución significativa de la capa muscular y no a cambios en el grosor del epitelio vaginal. Trabajos realizados por diversos autores muestran que la regulación de la capa muscular de la vagina estaría más asociada con el receptor de andrógenos (RA) que con el de estrógenos. La administración de testosterona en ratas castradas aumenta la densidad de RA en la capa muscular y el epitelio vaginal a

diferencia de lo que ocurre con el estradiol, que sub-regula la expresión de sus propios receptores en este órgano (Pessina *et al.*, 2006b). Es posible que el desbalance de la relación estrógeno-testosterona observada en los animales con autoinjerto, sea el responsable de los cambios observados en los tejidos que forman la pared de la vagina. Dado que no encontramos variación en la expresión del REalfa, sería importante estudiar si las respuestas observadas están vinculadas con cambios en la expresión del receptor a andrógeno. Los resultados del animal injertado en la etapa adulta fueron menos homogéneos y dependieron nuevamente tanto de la etapa (adulto joven, ó maduro) como del tiempo post-injerto analizado. Según lo descrito por Damous *et al.* (2008), el injerto de ovario realizado en animales adultos (entre 4 y 6 meses) provoca atrofia sobre el epitelio vaginal los primeros días post-injerto, alcanzando un tamaño semejante al epitelio de los animales control alrededor de 21 días post cirugía. Nuestros resultados muestran que la atrofia de los primeros días es revertida, alcanzando una hipertrofia que involucró tanto a la capa epitelial como a la muscular.

Nuestros resultados nos permiten concluir que:

- Las modificaciones morfofuncionales en los tejidos que componen la citoarquitectura de la vagina dependen de la edad a la que se realice el AI.
- La diferencia en la respuesta podría deberse a un desbalance en la relación estrógenos/andrógenos que se observa en los animales injertados.
- El efecto de este desbalance dependería de la edad del animal, ya que cuando el injerto de ovario se realiza en un animal prepúber la vagina aún no ha alcanzado su máximo crecimiento y desarrollo y dichos procesos ocurren en un ambiente endócrino “desbalanceado”. En el animal adulto injertado el desbalance se presenta una vez que la vagina ya está completamente desarrollada, y el impacto no es tan drástico.

Perspectivas

Sería interesante estudiar la expresión del receptor de andrógenos (inmunohistoquímica y ARNm) en la vagina de ratas control y con autoinjerto de ovario, a diferentes edades, para analizar si existen variaciones que pudieran explicar, al menos en parte, los resultados obtenidos en este trabajo respecto de las concentraciones plasmáticas de andrógenos en las ratas tratadas.

Modelo

En la vagina existen diferentes tipos de receptores a estrógenos (RE). En el epitelio, se encuentran los RE alfa y beta, mientras que en la capa muscular, se encuentran RE y también receptores de andrógenos (RA).

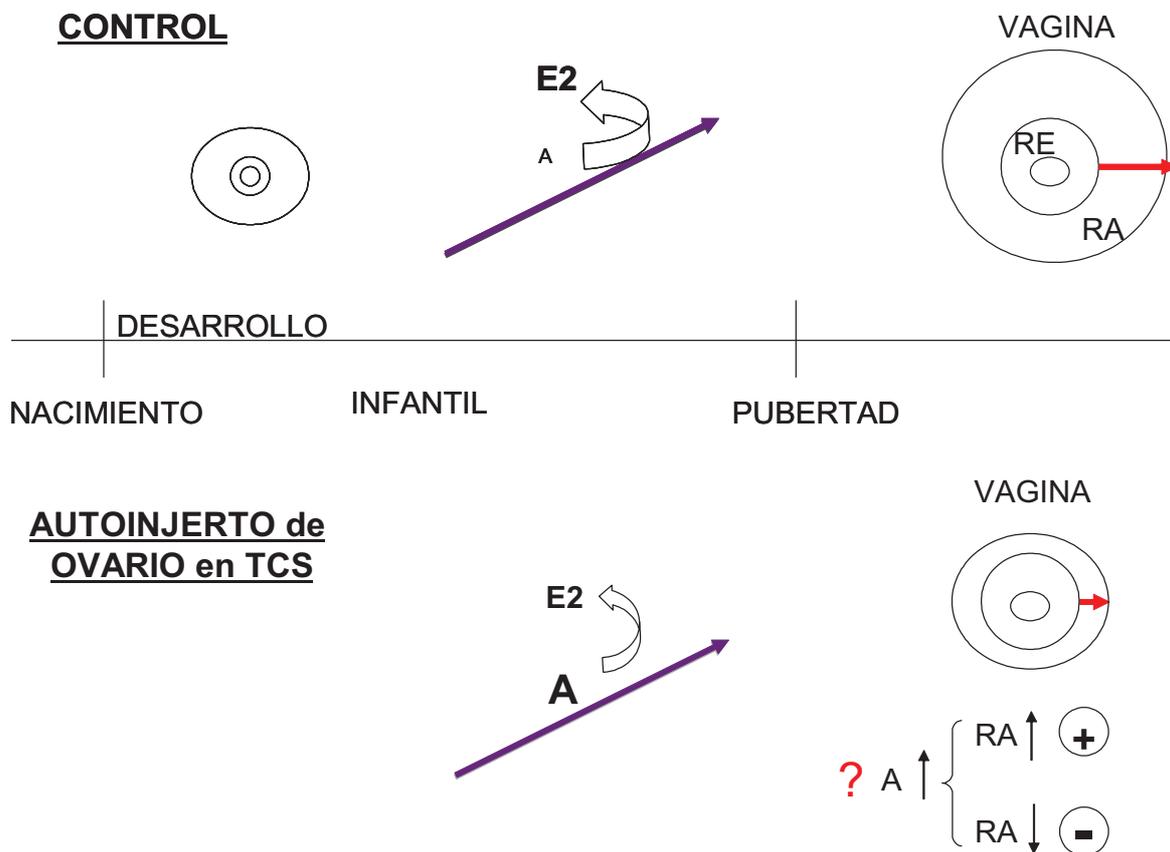
Desde el comienzo de la infancia hasta el periodo prepuberal, la secreción de gonadotropinas esta suprimida a niveles muy bajos. Hacia la pubertad, ocurre la activación de la función ovárica que inicia una secreción pulsátil de GnRH-LH que es responsable de la reactivación de la síntesis y secreción de gonadotropinas (FSH y LH). El comienzo de la esteroidogénesis en los ovarios requiere estimulación del compartimento de las células intersticiales de la teca por la LH y de la estimulación con FSH en las células de la granulosa. Las hormonas sexuales esteroideas producidas en el ovario, ejercen sus efectos sobre órganos diana que poseen receptores para poder responder.

En la vagina, ocurren cambios estructurales significativos en respuesta a variaciones en los niveles de hormonas sexuales esteroideas. La presencia de RE α se ha demostrado el epitelio, músculo y fibroblastos del estroma de la vagina de humanos y animales. Existe, aunque débil, expresión de RE β en las células de estroma subepitelial de la vagina de ratas y en la pared anterior de la vagina de mujeres. El RA se ha detectado en el epitelio, músculo liso, endotelio vascular y estroma de la vagina humana y de otras especies.

En este estudio, hemos observado que si se extrae el ovario durante la etapa juvenil y se injerta en tejido celular subcutáneo, los niveles de andrógenos aumentan de manera significativa respecto a animales control. La vagina de los animales tratados resulta

más pequeña que la de un animal control, debido a una disminución significativa del grosor de la capa muscular. Si en estos animales con concentraciones plasmáticas de andrógenos elevadas se encontrara expresión del RA aumentada en la capa muscular, se podría sugerir un modelo de loop positivo, por el cual los andrógenos regularían “en más” la expresión de sus propios receptores, siendo éstos los principales reguladores de la capa muscular de la vagina. Por el contrario, si la expresión de RA en el músculo estuviera disminuida, entonces podría pensarse en modelo de loop negativo, a través del que ésta hormona actuaría regulando “en menos” sus receptores.

Figura 11 Hipótesis de modelo propuesto para explicar la regulación de los RA en la vagina



ANEXO I

Procesamiento histológico de muestras biológicas

La histología es el estudio de los tejidos y de la organización de estos tejidos para constituir los órganos. Los tejidos están constituidos por células y matriz extracelular y se puede considerar que estos elementos constituyen una entidad continua que funciona conjuntamente. El pequeño tamaño de las células y de los componentes de la matriz extracelular hace que la histología dependa del uso del microscopio.

El procedimiento más utilizado para el estudio microscópico de los tejidos es la preparación de cortes histológicos. Los cortes finos se obtienen a partir de tejidos y órganos en los que es necesaria la aplicación de una serie de procedimientos previos para que se puedan seccionar mediante instrumentos de gran precisión llamados micrótomos. Luego, para su estudio microscópico, la mayor parte de los cortes histológicos deben estar teñidos.

Con el microscopio óptico es posible estudiar la imagen debido a que el corte histológico es atravesado por un haz de luz.

El objetivo de un preparado histológico es mostrar las estructuras celulares y tisulares de un organismo o de una porción del mismo. Durante el procesamiento, es necesario que estas estructuras mantengan sus características similares a las del organismo vivo. Es importante obtener un preparado permanente y representativo.

Las piezas fijadas y por tanto endurecidas, deben de ser "incluidas" en una masa rígida (parafina) para poder ser cortadas. Debido a que la parafina no es soluble en agua, las muestras deben ser previamente deshidratadas y para ello se realizan sucesivos baños que contienen una solución acuosa progresivamente creciente en concentración de alcohol (alcohol 70%, alcohol 80%, alcohol 95%). El último baño contiene alcohol puro (100%), y en él las muestras están completamente deshidratadas.

Para permitir la entrada del medio de inclusión a las muestras, éstas se colocan en un disolvente intermediario (cloroformo), que quita el alcohol y permite la entrada de la parafina al tejido. Para que la parafina entrara de forma gradual a las muestras, se realizaron tres baños de parafina en una estufa de 58-60°C ya que a estas temperaturas la parafina es líquida y puede penetrar los tejidos. A medida que la parafina ingresa sustituye al cloroformo que es liberado al medio. Debido a esto las muestras se cambiaron dos veces de baño, hacia parafina más limpia. (Junqueira & Carneiro, 2005)

Inclusión de la muestra biológica en parafina

1. Alcohol 70	
2. Alcohol 95 I	40 minutos
3. Alcohol 95 II	40 minutos
4. Alcohol 100	40 minutos
5. Cloroformo I	40 minutos
6. Cloroformo II	40 minutos
7. Parafina I	30 minutos
8. Parafina II	30 minutos

Para la formación de los bloques de parafina en los que se incluyeron de forma definitiva las muestras, se utilizaron las barras de Leuckart. En el espacio resultante entre las barras se colocó la parafina fundida y con una pinza se orientaron las vaginas dentro de ella. Una vez solidificada la parafina, el bloque que contiene la muestra de interés está listo para continuar el procesamiento.

Los bloques de parafina que se desean cortar se adhieren con calor, por la cara opuesta a la cara de corte, a una platina que se coloca en el micrótopo.

Se talla con una hoja de afeitar la cara de corte para aproximarnos a la porción del bloque que contiene la muestra. Los bordes superior e inferior de dicha cara deben de ser paralelos para facilitar la recolección de los cortes. Los primeros cortes que se obtienen, son examinados al microscopio óptico para poder identificar en ellos la aparición del tejido de interés, en este caso los cortes de la vagina. A medida que se corta, se obtienen cintas de parafina que contienen los cortes de la muestra. Estas cintas son retiradas con un pincel húmedo y llevadas hasta un baño de agua destilada caliente. La temperatura del agua es más baja que la temperatura de fusión de la parafina, lo que permite que la cinta se estire sin que la parafina se funda. Luego con portaobjetos se intenta recoger la cinta que está flotando en el baño. Se sumerge el portaobjeto en el agua y con la punta del pincel se arrastra la cinta hasta éste. Luego se levanta el portaobjeto de manera que la cinta de parafina quede adherido a él.

Los cortes en parafina, una vez adheridos al portaobjetos, deben pasarse por los diversos colorantes para conseguir un mayor contraste entre los constituyentes del tejido. Como la mayor parte de los colorantes se emplean en solución acuosa, es preciso extraer la parafina mediante un solvente adecuado, en nuestro caso utilizamos xilol. Este solvente debe extraerse a su vez por alcohol absoluto y a partir de aquí se llevan los cortes hasta un medio acuoso mediante soluciones de alcohol decrecientes. (Junqueira & Carneiro, 2005)

Desparafinar e hidratar los cortes histológicos

1. Xilol I	15 minutos a temperatura ambiente
2. Xilol II	10 minutos a temperatura ambiente
3. Alcohol 100	1 pasaje (5 minutos)
4. Alcohol 95	2 pasajes
5. Alcohol 70	1 pasaje
6. Alcohol 50	1 pasaje
7. Agua destilada	2 pasajes

Durante todo el proceso de tinción, se colocan los portaobjetos con los cortes en cajas de Koplín, cajas de vidrio grueso con ranuras de vidrio en su interior que permiten ubicar los portaobjetos de forma que no estén en contacto entre sí.

La primera solución colorante empleada fue la hematoxilina que tiene afinidad por las estructuras ácidas. Núcleos, ribosomas y retículo endoplásmico rugoso tienen gran afinidad por este colorante debido a su alto contenido de ADN y ARN respectivamente. Tras la tinción, los cortes adquieren un color rojizo por lo que es necesario realizar un viraje con agua corriente para que las sales del agua provoquen el cambio al color violeta. Luego, la segunda solución colorante empleada fue la eosina, un colorante ácido que tiñe estructuras básicas de rojo o rosa. La mayoría de las proteínas citoplasmáticas son básicas y por ello el citoplasma generalmente se tiñe de rosa.

Tras haber incorporado los colorantes a los cortes, se realiza una deshidratación de los preparados con baños sucesivos de concentraciones crecientes de alcohol y finalmente por xilol, dejándolos sumergidos hasta el momento del montaje. Para la preservación de las preparaciones histológicas se utiliza un medio de montaje, en nuestro caso el bálsamo de Canadá que polimeriza y no permite la entrada de agua ni de aire al preparado y se coloca sobre ellas un cubre objeto de vidrio. Si hubiesen quedado burbujas de aire entre el porta y el cubre objetos, se intenta eliminarlas. (Junqueira & Carneiro, 2005)

Tinción de los cortes histológicos con Hematoxilina – Eosina

1. Hematoxilina de Mayer	8 a 10 minutos
2. Virado con agua corriente	10 minutos
3. Lavado con agua destilada	
4. Eosina amarilla	1 minuto
5. Lavar con agua corriente	brevemente
6. Deshidratar	
Alcohol 70, 95, 100	5 minutos c/u
Xilol	
7. Montaje	

ANEXO II

Inmunohistoquímica Receptor Estrógeno alfa

- 1) Seleccionar los portaobjetos con el corte histológico de interés
- 2) Desparafinar:
 - Xilol 1 15 minutos
 - Xilol 2 10 minutos
- 3) Hidratar:
 - Alcohol 100 5 minutos
 - Alcohol 95 5 minutos
 - Alcohol 70 5 minutos
 - H2O d 5 minutos
- 5) PBS 1x (Ph=7.4) 5 minutos a Temperatura ambiente
- 6) PBS 1x + H2O2 (9.11%) 20 minutos
- 7) 2 lavados con PBS 1x 5 minutos c/u
- 8) Reavivado antigénico
 - Buffer citrato 10 mM pH=6
 - Colocar los preparados en koplín con citrato
 - Koplín (semi tapado) microondas a baño maría Pot 20 30 min
 - Sacar del microondas y dejar que alcance temperatura ambiente
- 9) 3 lavados con PBS 1x 5 minutos c/u
- 10) Poner preparados en cámara de humidificación
- 11) Permeabilización
 - PBS 1x + Tritón 0.5% por 15 minutos
- 12) Bloqueo de uniones inespecíficas
 - Sol de bloqueo 1 por 30 minutos
 - Sol de bloqueo 2 PBS + tritón 0.5% + 2% albúmina (BSA) por 30 minutos
- 13) Incubación AC primario por 12 hrs a 4° C
- 14) Dejar que alcance temperatura ambiente
- 15) 3 lavados con PBS 5 minutos c/u
- 16) Incubación Anticuerpo secundario 1 hora ambiente
- 17) 3 lavados PBS 5 minutos c/u
- 18) Incubar con ABC por 1 hora a temperatura ambiente
- 19) 3 lavados PBS 5 minutos c/u
- 20) Revelado Kit de DAB (diaminobencidina) según indicaciones del fabricante
- 21) Lavado con H2O corriente
- 22) Deshidratar: Alcohol 70, 95, 100 5 minutos c/u
- 23) Xilol

REFERENCIAS

- Antal, MC et al. 2008. **Sterility and absence of histopathological defects in non reproductive organs of a mouse ER β -null mutant.** Proc Natl Acad Sci USA, 105: 2433-2438
- Aubard, Y et al. 1999. **Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep.** Hum Reprod, 14,2149-2154.
- Bahr, J and & Humphrey, HC. 1998. **Ovary overview.** En: Knobil E & Neill JD, Editors. Encyclopedia of Reproduction. Academic Press. Vol 3, P 590-597
- Baird, DT et al. 1999. **Long term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196°C.** Endocrinology, 140, 462-471.
- Blurton-Jones, MM et al. 1999. **Estrogen receptor immunoreactivity in the adult primate brain: neuronal distribution and association with p75, trkA, and choline acetyltransferase.** J Comp Neurol, 405(4): 529-542
- Brown, TR. 1998. **Steroid hormones overview.** En: Knobil E & Neill JD, Editors. Encyclopedia of Reproduction. Academic Press. Vol 4, P 634-643
- Butler, JA et al. 1999. **Evidence for extensive distribution of oestrogen receptor alpha-immunoreactivity in the cerebral cortex of adults rats.** J Neuroendocrinol, 11(5):325-329
- Callejo, J et al. 2001. **Long-Term Ovarian Function Evaluation after Autografting by Implantation with Fresh and Frozen-Thawed Human Ovarian Tissue.** J Clin Endocrinol Metab, 86(9):4489-4494
- Callejo, J et al. 2002. **Heterotopic ovarian transplantation without vascular pedicle in syngeneic Lewis rats: long-term evaluation of effects on ovarian structure and function.** Fertil Steril, 2002, 77(2):396- 402
- Candy, CJ et al. 2000. **Restoration of a normal reproductive life span after grafting of cryopreserved mouse ovaries.** Hum Reprod 15, 1300-1304.
- Chambón, P. 2005. **The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the two first decades.** Molecular Endocrinology 19(6): 1418-1428
- Chávez R & Domínguez R.1994. **Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of compensatory ovarian hypertrophy: the effects of its section performed on each day of the oestrous cycle** J. Endocrinol 140: 197 - 201
- Cox, SL et al. 1996. **Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice.** J Reprod Fertil 107,315-322.

- Damous, L et al. 2008. **Indirect evaluation of estrogenic activity post heterotopic ovarian autograft in rats.** Acta Cir Bras, 23 (4) 373
- Enmark, E et al. 1997. **Human Estrogen Receptor (beta)gene structure Chromosomal Localization, and Expression Pattern.** J Clin Endocrinol Metab, 82(12): 4258-4265
- Fawcett, DW. 1995. **Sistema Reprodutor Femenino.** En: Tratado de Histología Bloom Fawcett. 12ª Edición. Madrid: Mc Graw Hill Interamericana. P 885-932
- Forsberg A. 1995. **A morphologist approach to the vagina – age related changes and estrogen sensitivity.** Maturitas (22) Suppl, S7-S15
- Germain, P et al. 2006. **Overview of nomenclature of nuclear receptors.** Pharmacol Rev 58: 685-704
- Gosden, RG et al. 1994. **Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C.** Hum Reprod 9, 597-603.
- Gosden, RG et al. 2000. **Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue.** Mol Cell Endocrinol 163, 125-129.
- Harp, R et al. 1994. **Cryopreservation of murine ovarian tissue.** Cryobiology 31, 336-343.
- Hsueh, AJ et al. 1984. **Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells.** Endocr Rev 5:76-127
- Imamov, O et al. 2005. **Estrogen receptor beta in health and disease.** Biol Reprod 73(5): 866-871
- Junqueira, L & Carneiro, J 2005. **La histología y sus métodos de estudio.** En: Histología Básica Texto y Atlas. 6ª edición. Barcelona. Editorial Masson. P 1-22
- Krege, JH et al. 1998. **Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta** Proc Natl Acad Sci USA, 95(26):15677-15682
- Kuiper, GG et al. 1996. **Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary.** Proc Natl Acad Sci USA, 93: 5925-5930
- Lindzey, J & Korach, K. 1998. **Estrogen action on the female reproductive tract.** En: Knobil E & Neill JD, Editors. Encyclopedia of Reproduction. Academic Press. Vol 2, P79-86
- Liu, JH et al. 2002. **Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries.** Hum Reprod 17, 605-611

- Liu, JH. 1993. **Aparato reproductor femenino**. En: Bases Fisiológicas de la Práctica Médica Best & Taylor. 12ª Edición Editorial Médica Panamericana. P 1035-1048
- Lopez Mato, A. 2004. **Eje córtico límbico hipotálamo-hipófiso-gonadal**. En: Lopez Mato A. Psiconeuroinmunoendocrinología. Nuevos dilemas para viejos paradigmas. Viejos dilemas para neoparadigmas. Ed Pólemos. Buenos Aires. Argentina.
- Lubahn, DB et al. 1993. **Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene**. Proc Natl Acad Sci USA, 90:11162-11166
- Manolagas, SC et al 2004 **Kinase- mediated transcription, activators of nongenotropic estrogen-like signaling (Angels) and osteoporosis: a different perspective on the HRT dilemma**. Kidney Int Suppl. (91): S41-49
- Mowa, CN & Iwanaga, T. 2000a. **Developmental changes of the oestrogen receptor- α and - β mRNAs in the female reproductive organ of the rat – an analysis by in situ hybridization**. J Endocrinol.167, 363–369
- Mowa, CN & Iwanaga, T. 2000b. **Differential distribution of oestrogen receptor- α and - β mRNAs in the female reproductive organ of rats as revealed by in situ hybridization**. J Endocrinol 165, 59–66
- Nilsson, O et al. 2002. **Estrogen receptor – alpha and beta are expressed throughout postnatal development in the rat and rabbit growth plate**. J Endocrinol 173(3): 407-414
- Nugent, D et al. 1997. **Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects**. Hum Reprod Update, 3: 267-280.
- Papka, RE & Williams, SJ. 1998. **Vagina**. En: Knobil E & Neill JD, Editors. Encyclopedia of Reproduction. Academic Press. Vol. 4, P 961-968
- Pedersen, SB et al. 1991. **Nuclear estradiol binding in rat adipocytes. Regional variations and regulatory influences of hormones**. Biochim Biophys Acta 1093(1):80-86
- Pessina, M et al. 2006a. **Differential Effects of Estradiol, Progesterone, and Testosterone on Vaginal Structural Integrity**. Endocrinology 147(1):61–69
- Pessina, M et al. 2006b. **Differential Regulation of the Expression of Estrogen, Progesterone, and Androgen Receptors by Sex Steroid Hormones in the Vagina: Immunohistochemical Studies**. J Sex Med 3:804–814

- Press, M et al. 1986. **Estrogen Receptor Localization in the Female Genital Tract.** Am J Pathol 123:280-292
- Ramsey, TL et al. 2004. **Estrogen receptor beta isoforms exhibit differences in ligand-activated transcriptional activity in an estrogen response element sequence-dependent manner.** Endocrinology 145(1):149-160
- Ropero, AB et al. 2006. **Hard estrogen receptor alpha: distinct membrane and nuclear distribution patterns and regulation by estrogen.** J Mol Cell Cardiol 41(3): 496-510
- Ryan, KJ et al. 1968. **Steroid formation by isolated and recombined granulosa and thecal cells.** J Clin Endocrinol Metab 28:355-358
- Saji, S et al. 2000. **Estrogen receptor alpha and beta in the rodent mammary gland.** Proc Natl Acad Sci USA, 97(1):337-342
- Salle, B et al. 1998. **Freezing, thawing, and autograph of ovarian fragments in sheep: preliminary experiments and histologic assessment.** Fertil Steril 70, 124-128
- Salle, B et al. 1999. **Restoration of ovarian steroid secretion and histologic assessment after freezing, thawing, and autograft of a hemi-ovary in sheep.** Fertil Steril 72, 366-370.
- Saunders, PT et al. 1997. **Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) in multiple rat tissues visualized by immunohistochemistry.** J Endocrinol 154(3): R13-16
- Schnorr, J et al. 2002. **Functional studies of subcutaneous ovarian transplants in non-human primates: steroidogenesis, endometrial development, ovulation, menstrual patterns and gamete morphology.** Hum Reprod, 17, 612-619.
- Scobie, GA et al. 2002. **Human oestrogen receptors: differential expression of ER alpha and beta and the identification of ER beta variants.** Steroids 67(12):985-992
- Shaw, JM. 2000. **Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications.** Mol Cell Endocrinol 161, 103-110
- Shrestha, J et al. 2010. **Antiovarian and abortifacient effects of *Areca catechu* (betel nut) in female rats.** Indian J Pharmacol 42:306-11

- Shughrue, PJ & Merchenthaler, I. 2001. **Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system.** J Comp Neurol 436(1): 64-81
- Smith, C. 1998. **Estrogens overview.** En: Knobil E & Neill JD, Editors. Encyclopedia of Reproduction. Academic Press. Vol. 2, P 119-126
- Tena Sempere, M et al. 2000. **Neonatal exposure to estrogen differentially alters estrogen receptor alpha and beta mRNA expression testis during postnatal development.** J Endocrinol 165(2): 345-357
- Toft, D & Gorski, J. 1966. **A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization.** Proc. Natl. Acad. Sci USA, 55 (6): 1574-1581
- Torrents, E et al. 2003. **Applications of ovarian tissue transplantation in experimental biology and medicine.** Hum Reprod Update Vol. 9 (5): 471-481
- Vom Saal, F et al. 1994. **Natural history and mechanisms of reproductive aging in humans, laboratory rodents, and other selected vertebrates.** En: Knobil E & Neill JD, Editors. The Physiology of Reproduction. Raven Press. Vol. 2 P1213-1314
- von Eye Corleta, H et al. 1998. **Subcutaneous autologous ovarian transplantation in Wistar rats maintains hormone secretion.** Fertil Steril 70:16-19
- Wang, H et al. 2000. **Estrogen receptors alpha and beta in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle.** Biol Reprod 63 (5): 1331-1340
- Wang, X et al. 2002. **Cryopreservation: fertility after intact ovary transplantation.** Nature, 415, 385
- Weihua Z, et al. 2003. **Update on estrogen signaling.** FEBS Lett, 546 (1): 17-24
- Welsch, U. 2008. **Aparato genital femenino.** En: Histología. 2ª edición Editorial Médica Panamericana. P 500-520
- Yamashita, S et al. 2004. **Localization of the estrogen and androgen receptors in male reproductive tissues of mice and rats.** Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 279 (2): 768-778

Facultad de Ciencias

Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación,

Facultad de Medicina,

Facultad de Odontología.

Informe de pasantía

Licenciatura en Biología Humana

2010

Por: Br. Natalia Pi Denis

Tutor: Dr. Juan Claudio Benech

*Efecto del Factor de Necrosis Tumoral alfa en la
expresión de diferentes proteínas involucradas en
la señalización por Ca^{2+} en el Miometrio Humano*

Imagen tomada de Salvador Dalí

Agradezco a mi Tutor Dr. Juan Benech por su apoyo incondicional, por compartir conmigo todos sus conocimientos y la pasión por la investigación.

A Juan Pablo Damian (Juampa) por tu generosidad y apoyo incondicional en todo este proceso,

A mi familia,

A mi Amor.

Resumen

A la fecha se desconocen las causas que originan el desencadenamiento de trabajo de parto pretérmino. Evidencias experimentales involucran diversas citoquinas inflamatorias en el inicio y/o mantenimiento del mismo. En el momento del parto la producción de las citoquinas pro-inflamatorias (TNF α , IL1, IL6 e IL8) es favorecida comparada con las anti-inflamatorias (IL4, IL10). Los objetivos de este trabajo fueron corroborar en células de miometrio humano (CMH) en cultivo, que CD38 (proteína implicada directamente en el proceso de movilización del Ca²⁺ para la contracción) y su mensajero se elevan al tratarlas con TNF- α . Otro objetivo fue determinar la presencia y localización de CaMKIV (una proteína kinasa Ca²⁺ / Calmodulina dependiente) en CMH, así como el efecto de TNF- α sobre la expresión de la misma.

Células miometriales humanas fueron obtenidas a partir de muestras normales de miometrio humano y mantenidas en cultivo. El total de las células obtenidas de esta forma, mostró tinción positiva para α actina de músculo liso y respuesta a oxitocina. Las CMH en cultivo fueron tratadas durante 24 horas con TNF- α . A partir de este tratamiento se obtuvieron muestras para la determinación de CaMKIV (Western Blot e inmunocitoquímica láser confocal) y la medición del ARNm de CD38 por RT-PCR e inmunocitoquímica láser confocal. De acuerdo con estudios anteriores, observamos que el tratamiento de las CMH con TNF- α promovió un aumento en la expresión del ARNm de CD38. Los resultados mostraron por primera vez que estas células (CMH) expresan CaMKIV, con localización preferentemente nuclear y que su expresión fue elevada por el tratamiento con TNF- α . Nuestros resultados sugieren que CaMKIV podría estar involucrada en el proceso de activación del miometrio humano.

INDICE

1. Introducción.....	6
1.1 Homeostasis de Ca^{2+} en el miometrio humano	7
1.2 Vías de señalización de hormonas que participan en la homeostasis del calcio que promueven la contracción o relajación en el miometrio humano.....	10
1.2.1. Oxitocina.....	11
1.2.2. Prostaglandinas	12
1.2.3. Citoquinas.....	12
1.2.4. Factor de crecimiento epidérmico.....	13
1.3. Proteínas sensibles al calcio intracelular en células del músculo liso	14
1.4 Objetivos.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	15
2 - Materiales y Métodos	16
2.1 Caracterización del cultivo primario de células miometriales humanas.....	16
Cultivo primario de células miometriales humanas.....	16
Medidas de viabilidad	17
2.2 Métodos utilizados para la caracterización de las proteínas	18
Western Blot	18
Sistema de detección con fosfatasa alcalina	18
Sistema de detección por Quimioluminiscencia	18
2.3 Detección de CaMKIV por Western Blot y Quimioluminiscencia en cultivos primarios de CMH.....	19
Preparación de la muestra y Western Blot	19
Detección de Proteínas	19
2.4 Determinación del ARNm de CD38 en CMH por PCR semi-cuantitativo.	20
Extracción del ARN.....	20
RT-PCR: Amplificación de ARNm.....	21
Amplificación in-Vitro del ADNc: reacción en cadena polimerasa (PCR)	22
2.5 Medidas de Ca^{2+} intracelular en una única CMH, en respuesta a oxitocina	24
2.6 Microscopía láser confocal	25
2.6.1 Inmunocitoquímica y Microscopía láser confocal.....	27

3. Resultados	28
3.1 <i>Caracterización del cultivo celular primario de células miometriales humanas..</i>	28
3.2 <i>Efecto del TNFα en la expresión de la proteína CD38 en células miometriales humanas</i>	30
3.3 <i>Efecto del TNFα sobre el nivel de transcripción del ARNm de CD38 en células miometriales humanas.....</i>	32
3.4. <i>Detección y localización de CaMKIV en células del miometrio humano.</i>	33
3.5. <i>Efecto del TNF-α sobre la expresión de CaMKIV en CMH.....</i>	33
4. Discusión y Conclusiones	35
5- Referencias Bibliográficas	39

1. Introducción

Las contracciones del miometrio juegan un papel fundamental en la fisiología del útero. Disfunciones en las contracciones uterinas son causa de una prolongación en el trabajo de parto, que muchas veces llevan a intervenciones quirúrgicas para posibilitar la retirada del feto (López-Bernal, 2001).

Por otra parte, el inicio de las contracciones uterinas antes de término, pueden llevar a un trabajo de parto prematuro (antes de las 37 semanas de gestación). El trabajo de parto prematuro es el responsable del 10 % de los nacimientos y el 75% de las muertes neonatales, habiendo un alto porcentaje de mortalidad peri-natal (López-Bernal, 2007; Slattery and Morrison, 2002). En Uruguay nacen 4400 prematuros por año, siendo esta la principal causa de muerte en niños menores de 1 año. La cifra de mortalidad infantil en 2008 osciló en 10.6 por mil, y de ese índice el 60% de los decesos se produce en el período neonatal: 28 primeros días de vida. (Cifras obtenidas del Ministerio de salud Publica, Programa de Salud de la Niñez)

El último trimestre del embarazo es necesario para la maduración de los pulmones del feto y otros órganos en la preparación para la vida extrauterina. Si este proceso se ve interrumpido por un parto prematuro, las posibilidades de supervivencia del recién nacido se ven gravemente disminuidas. La tasa de mortalidad es mayor en edades gestacionales menores (López-Bernal 2007). No se conocen con exactitud, los mecanismos que regulan la preparación del miometrio para el trabajo de parto y menos aun en lo que respecta al parto prematuro.

Las citoquinas parecen jugar un papel importante en este sentido. Durante el trabajo de parto, el patrón de producción de citoquinas es alterado y la producción de citoquinas pro-inflamatorias es favorecida comparada con las anti-inflamatorias (López-Bernal, 2001; Slattery and Morrison, 2002). Estas alteraciones, parecen cumplir un rol importante que culminan con un nacimiento correcto del feto. Por tanto, resulta fundamental entender las vías de señalización reguladas por hormonas y citoquinas durante el embarazo y el trabajo de parto.

1.1 Homeostasis de Ca^{2+} en el miometrio humano

El útero es un órgano miogénico y se contrae de forma espontánea siguiendo ondas de actividad eléctrica que resultan de la despolarización de la membrana de las células del tejido miometrial, produciendo un aumento en el calcio intracelular (López- Bernal 2007). En el miometrio, una interacción compleja de segundos mensajeros intracelulares esta relacionado con la homeostasis de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y la contracción de la musculatura uterina (Lynn *et al*, 1993; Martin *et al*, 1999; Sanborn, 2000; Tribe, 2001; Young and Zhang, 2001; Young and Mathur, 1999). La regulación $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es un factor clave en la modulación de las contracciones uterinas (López-Bernal, 2001; Slattery and Morrison, 2002; Tribe, 2001; Phillippe and Chien, 1998). Hasta la fecha, los mecanismos que regulan la homeostasis de Ca^{2+} en el miometrio humano no han sido completamente elucidados. Entender las vías de señalización que regulan las señales transitorias de Ca^{2+} promovidas por diferentes agonistas, es imperativo para el desarrollo de nuevas terapias que permitan tratar problemas fisio-patológicos de la contracción miometrial.

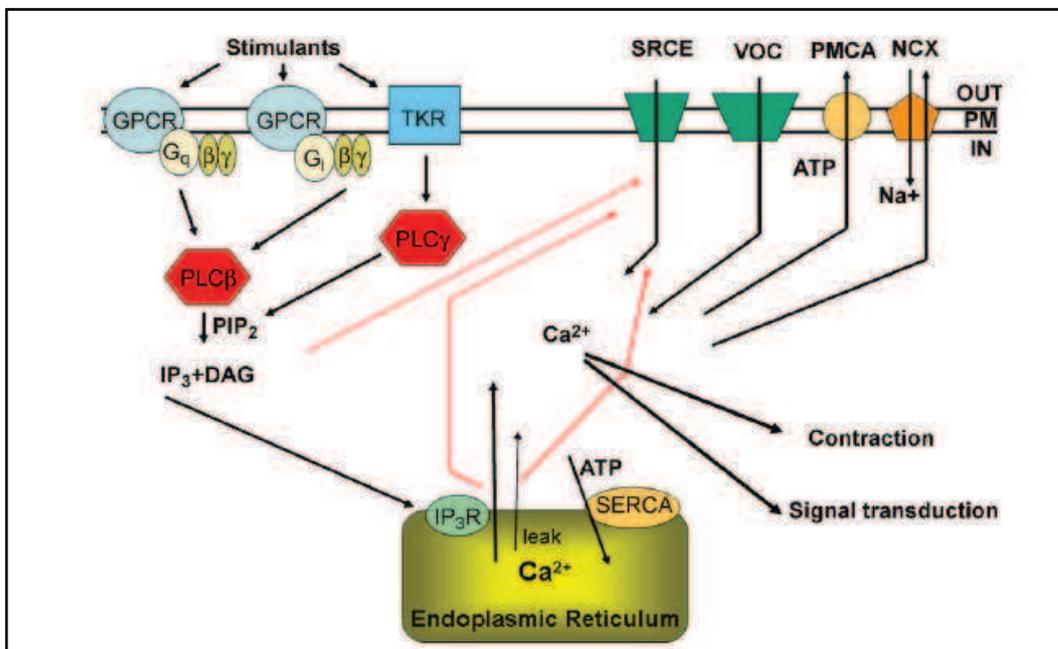
Dos sistemas intracelulares de liberación de Ca^{2+} han sido caracterizados en el miometrio humano, el sistema dependiente de IP_3 y el sistema dependiente de receptores de ryanodina (RyR). Sin embargo, solamente la vía de señalización por receptores de IP_3 ha sido estudiada en profundidad, como se describirá posteriormente (Phillipe and Chien, 1998).

En el miometrio, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta como resultado del ingreso de Ca^{2+} por los canales catiónicos a través de la membrana plasmática y por la liberación de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} localizados en el retículo endoplásmico (Sanborn , 2007). La entrada de calcio al citosol desde el medio extracelular esta dada por canales ubicados en la membrana plasmática (Burgoyne R.D *et al*, 1997; Michaelis E.K ,1998). Las dos principales rutas de salida del calcio citosolico al exterior son una Ca^{2+} ATPasa y un intercambiador iónico $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La Ca^{2+} ATPasa, PMCA (Plasma Membrana Calcium ATPase) es un sistema de alta afinidad y baja capacidad de transporte. En cambio el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es un sistema de baja afinidad por Ca^{2+} pero con alta capacidad de transporte (Carafoli E. 2005). Estas rutas antes descriptas producen un descenso de la concentración de Ca^{2+} intracelular. La entrada de

calcio al citosol desde el medio extracelular, también se ve afectada indirectamente por otros mecanismos, como la hiperpolarización producida en la célula a través de la activación de los canales de K^+ y el descenso de la entrada de Ca^{2+} mediada por canales sensibles a voltaje (Voltage Operated ion Channels, VOC) (Sanborn 2007).

Dentro de la célula los reservorios cuentan con rutas específicas de entrada y salida del Ca^{2+} . El retículo endoplásmico (RE) es el principal reservorio de calcio en la célula y está implicado en procesos de mantenimiento de la homeostasis y señalización (Carafoli .E, 2002). Este RE cuenta con una Ca^{2+} ATPasa, SERCA (Sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase) similar a la de la membrana plasmática ya descrita anteriormente. Este reservorio también cuenta con canales que liberan calcio al citoplasma en respuesta a segundos mensajeros específicos: a) canales de respuesta a ryanodina RyR (Ryanodine Receptor) y b) canales de respuesta a inositol 1, 4,5 trifosfato, IP_3 R (IP_3 Receptor). Ambos tipos de canales exhiben liberación de calcio inducida por calcio. (Galione. A, *et al*; 2002).

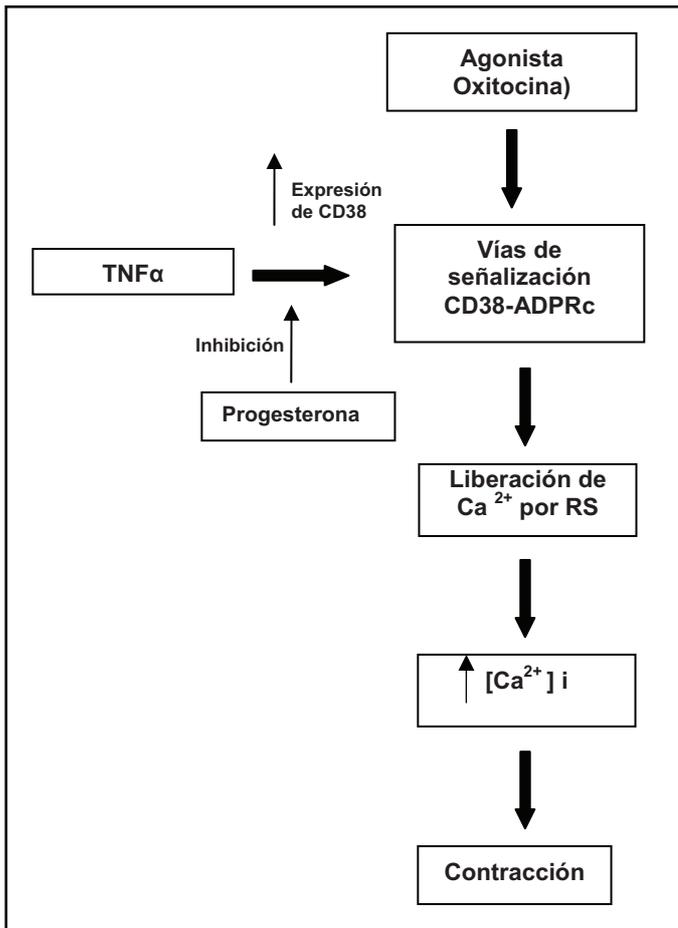
Figura 1. Homeostasis del calcio en el miometrio humano



(Tomado de Sanborn B *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18 (2007) 305–314)

Como fue mencionado anteriormente, la vía de liberación de Ca^{2+} por los receptores de IP_3 , ha sido la más estudiada en el miometrio humano como se observa en la figura 1. Con respecto a la segunda vía mencionada (RyR), existen pocos trabajos al respecto en la literatura especializada.

La ADP-ribosa cíclica (ADPRc) es un nucleótido que se encuentra en forma natural y existen evidencias de que la misma está involucrada en la regulación de las propiedades de los mecanismos de disparo del receptor de ryanodina (RyR). Recientemente, ha sido propuesto que ADPRc sería un segundo mensajero intracelular (Chini and Toledo, 2001; Coronado and Morrissette, 1994; Dousa *et al*, 1996; Galione, 1994; Lee, 1997). En tejido de mamífero, este nucleótido es metabolizado por CD38 una enzima bi-funcional capaz de sintetizar e hidrolizar ADPRc, (Chini and Toledo, 2001; Dousa *et al*, 1996). Por lo tanto, ADPRc es un candidato importante a segundo mensajero para regular los RyR en miometrio humano. En células de vertebrados, una gran variedad de estímulos biológicos han sido implicados en la regulación de la actividad ciclasa de ADP-ribosa y de los niveles crecientes de ADPRc. De estos estudios, han surgido dos modelos diferentes de la regulación de los niveles intracelulares de ADPRc: 1) el modelo de acción hormonal lenta (slow-acting), como propuesta por Dousa *et al*, 1996 y 2) el modelo de acción hormonal rápida (fast-acting) (Chini and Toledo, 2001). Este modelo de regulación por ADPRc se ha demostrado en células de la musculatura lisa intestinal y traqueal (Kuemmerle and Makhlouf, 1995; Prakash *et al*, 1998). También se ha reportado que ADPRc juega un papel importante en las señales transitorias de Ca^{2+} inducidas por oxitocina, en células del miometrio humano (Barata *et al*, 2004). En este trabajo, se demuestra que las señales transitorias de Ca^{2+} inducidas por oxitocina en este tipo celular, fueron significativamente aumentadas por $\text{TNF}\alpha$, así como el ARNm de CD38, la expresión de CD38 y su actividad ciclasa. Tal como lo muestra en el modelo propuesto por el trabajo de Barata *et al* 2004 que se detalla a continuación:



1.2 Vías de señalización de hormonas que participan en la homeostasis del calcio que promueven la contracción o relajación en el miometrio humano.

Muchas hormonas que promueven la contracción, actúan en la actividad uterina, estimulando los receptores acoplados a proteína G que se encuentra localizados en la membrana plasmática de la célula (López-Bernal, 2001). Estos receptores, estimulan proteínas triméricas unidas a GTP tales como, $G\alpha qG\beta\gamma$ que actúa en la generación de múltiples señales intracelulares. Algunas de estas moléculas de señalización, impactan directamente en la homeostasis del calcio, mientras que otras lo hacen indirectamente modificando diferentes vías, impactando de manera positiva o negativa. (Sanborn, 2007). Una vía utilizada por algunas hormonas que inducen contracción, es la activación de las isoformas $C\beta$ de la fosfolipasa C (PLC), cuyos productos resultantes de su hidrólisis en la membrana plasmática son el 1, 4, 5 inositol-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) (Ver figura 1, Sanborn

,2007). El IP_3 se une a los receptores que se encuentran localizados en el retículo endoplásmico estimulando la liberación del calcio que se encuentra almacenado en el mismo, aumentando así la concentración intracelular del mencionado ión (Sanborn, 2007). El inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP_3) es producido en la célula a partir de fosfatidil-inositol 4, 5 bi-fosfato (PIP) por acción de la enzima fosfolipasa C (PLC) (Burgoyne, *et al*; 1997). En el citosol, el IP_3 , se une a receptores específicos que se encuentran localizados en la membrana del retículo endoplásmico (Mikoshiba *et al*; 1994). Adicionalmente, las señales generadas por la activación del IP_3 y DAG estimulan un tipo de canales contribuyendo a la entrada de calcio por los receptores operados por calcio. Este tipo de entrada regulada por calcio se denomina "Signal Regulated Calcium Entry" (SRCE), es dependiente de señales generadas por la acción hormonal, provocando así diferentes efectos en la actividad contráctil del músculo miométrico (Sanborn, 2007).

1.2.1. Oxitocina.

Indiscutiblemente se ha identificado a la oxitocina como uno de los agentes uterotónicos más potentes (Bo Liu *et al*; 2005). La oxitocina es un péptido natural responsable de la contracción del miométrio durante el parto. (López-Bernal, 2001), teniendo un destacado rol en la promoción de contracciones en el útero en etapas posteriores al parto, en el inicio del puerperio y durante la lactancia (facilitando la eyección de leche). La concentración de receptores de oxitocina (ROXT) en el miométrio es muy alta en etapas finales del embarazo, haciendo que el útero sea muy sensible a la hormona (López-Bernal, 2007). Los ROXT, actúan acoplados a varias proteínas G. La importancia relativa de diversas vías que involucran proteínas G en la señalización de la oxitocina puede variar entre la especie y el tipo celular. Esta hormona también estimula el efecto del factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), sobre la vía de ADP ribosa cíclica (ADPRc) a través de los receptores de rianodina (RyR), conduciendo así a un aumento en la liberación intracelular de calcio (Thompson M, *et al*; 2004, Dogan S, *et al*; 2006). Recientemente, ha sido publicado que la acción de la oxitocina vía $G\alpha_qG\beta\gamma$ en miométrio de rata con preñez, resulta en un aumento en la producción de AMP cíclico (Zhou X, *et al*; 2007).

1.2.2. Prostaglandinas

El útero produce varias prostaglandinas tales como la E y F2 α . Además expresa un número variable de receptores para las mismas. Los receptores de prostaglandinas pueden estar localizados en la membrana plasmática y nuclear de la célula. Dicha localización puede modificarse durante la gestación (Sanborn ,2007). El inicio del trabajo de parto se desencadena por la liberación de la prostaglandina F2 α por parte del endometrio, que conduce a la desaparición del cuerpo lúteo. La luteólisis también esta mediada por la activación de los receptores de la prostaglandina F2 α y provoca una caída de los niveles de la progesterona materna que es rápidamente seguido por el inicio del parto (López-Bernal, 2007).

Las prostaglandinas producen un aumento de la concentración de calcio intracelular, estimulando los mecanismos de entrada y liberación del mismo, siendo estos mecanismos dependientes de la concentración de Ca²⁺ extracelular (Sanborn ,2007).

1.2.3. Citoquinas

En el parto se ha reportado procesos inflamatorios que involucran a diferentes tejidos tales como el miometrio, la placenta y el cervix, producto de la invasión de leucocitos que son atraídos por un aumento en la adhesión celular inmediatamente después del inicio del parto. En el proceso del parto se ven involucrados tres pasos fisiológicos independientes: a) el remodelado del cervix b) la ruptura de membranas superpuestas en la región del cervix y c) la iniciación de contracciones rítmicas que aumenta su amplitud y frecuencia para posibilitar la expulsión del feto (Young, *et al* ; 2002).

Las citoquinas proinflamatorias que participan en este proceso, constituyen un grupo diverso de compuestos que incluyen a las interleukinas (IL) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Se han descripto 14 moléculas de interleukinas (IL-1 a IL-14), pero solamente algunas tienen relevancia específica en la fisiología y patología perinatal. Estas son la IL-1, IL-6, IL-8, así como TNF α . (Grandi. C; 1996.)

Las citoquinas proinflamatorias tales como IL1 β y TNF α inducen la maduración del cervix mediante un aumento de la matriz metaloproteínasa (MMP). Estas han sido inmunolocalizadas en los leucocitos en el miometrio humano (Young, *et al*; 2002). Los efectos que producen las citoquinas en la actividad del miometrio humano han sido poco elucidados, siendo la vía más estudiada la que ejercen indirectamente a través de un aumento de las prostaglandinas PGF2 α y PGE2 provocado por la inducción de la ciclooxigenasa -2 (COX-2). En la literatura existen pocos trabajos referidos a los efectos directos de las citoquinas en el miometrio. Un ejemplo es la vía β -adrenérgico/ adenil- ciclasa como sitio potencial de dichos efectos en el miometrio. En otros tipos celulares TNF α aumenta la actividad adenil-ciclase (AC) (Gogarten *et al*; 2003). En el trabajo de Gogarten y sus colaboradores en 2003, se demuestra que TNF α aumenta la actividad AC en células miometriales humanas. Estos cambios se observan a nivel de la propia enzima o acoplada a proteínas G.

Por otra parte, Hertelendy y colaboradores en 1993, demostraron que hay un aumento en la producción de AMPc cuando se exponen las células miometriales humanas a TNF α o a IL-1. Este efecto sin embargo, requiere de concentraciones altas de TNF α , indicando que las células derivadas de miometrio a término son más susceptibles que las que derivan de miometrio carente de este fenómeno. (Gogarten *et al*; 2003).

1.2.4. Factor de crecimiento epidérmico

El factor de crecimiento epidérmico (FCE) también está implicado en la homeostasis de calcio en el miometrio humano. Los receptores del factor de crecimiento epidérmico (RFCE) poseen actividad tirosina-quinasa produciendo la estimulación directa de PLC γ por la fosforilación de la tirosina. En el miometrio esto resulta en la generación de IP $_3$ y por lo tanto en un aumento del Ca $^{2+}$ intracelular. La activación de los RFCE participa en las oscilaciones de la [Ca $^{2+}$] i en el miometrio y también en la señalización mediada por receptores de oxitocina. (Sanborn, 2007).

1.3. Proteínas sensibles al calcio intracelular en células del músculo liso

El efecto del calcio intracelular sobre la contracción muscular ha sido ampliamente estudiado como se ha explicado previamente. Sin embargo, el efecto del calcio como segundo mensajero intracelular en la activación o inhibición de determinadas enzimas y en la expresión de genes se ha venido desarrollando principalmente en la última década.

Es conocido que los cambios en la concentración intracelular de calcio afecta la actividad de las enzimas proteínas kinasas dependientes de calcio y calmodulina (CaMK) (Lobo *et al*; 1999). Dos miembros de esta familia de enzimas se expresan en el músculo liso: la CaMKII y la CaMKIV (Cartin *et al*; 2000). Mientras que en el músculo esquelético CaMKIV no se expresa endógenamente, si lo hace CaMKII (Bassel-Duby y Olson, 2006). Estas proteínas una vez que son activadas por calcio pueden estimular la transcripción de varios genes por diferentes vías (CREB, CRE, elementos CArG), como fue demostrado en el músculo liso de arterias (Najwer y Lilly, 2005). CaMKIV tiene una localización preferencialmente nuclear en el músculo liso, al igual que en otros tejidos (cerebro, testículo, linfocitos), donde activa CREB por fosforilación, el que posteriormente estimula la expresión de varios genes c-fos (Wamhoff *et al*; 2006; Tremper-Wells y Vallano, 2005; Hook and Means, 2001). Mientras que CaMKII se localiza preferentemente en el citosol donde funciona modulando la sensibilidad de la kinasa de la cadena pesada de la miosina al calcio, así como también participa en la regulación de los canales de calcio y de las bombas SERCA (Ca²⁺-ATPasa del retículo sarcoplásmico) y activación de MAP Kinasas (Wamhoff *et al*; 2006, Tremper-Wells y Vallano, 2005). CaMKII también puede fosforilar CREB, pero a diferencia de CaMKIV la CaMKII fosforila CREB en un sitio de regulación inhibitor (Wamhoff *et al*; 2006).

Una revisión reciente sobre la dinámica del calcio a nivel del miometrio (Sanborn, 2007) sugiere que las CaMKs junto a otras proteínas kinasas podrían modular la respuesta al calcio. Sin embargo, a la fecha, la expresión de estas proteínas Kinasas en el miometrio y su posible función en la regulación génica y activación de otras enzimas son desconocidas.

1.4 Objetivos

Objetivo general

Caracterización de un modelo in vitro para el estudio de la expresión de dos proteínas (CD38 y CaMKIV) involucradas en la homeostasis del Ca^{2+} en el miometrio humano. Efecto del Factor de Necrosis Tumoral Alfa ($\text{TNF}\alpha$).

Objetivos específicos

1. Caracterización del cultivo celular primario a partir de muestras de tejido de miometrio humano
2. Corroborar que la expresión de la proteína CD38 y su ARNm aumentan tratando a las células miometriales humanas (CMH) con $\text{TNF}\alpha$.
3. Determinar la presencia de la proteína CaMKIV en células miometriales humanas.
4. Determinar si la expresión de la proteína CaMKIV es modificada en células miometriales humanas tratadas con $\text{TNF}\alpha$.

2 - Materiales y Métodos

2.1 Caracterización del cultivo primario de células miometriales humanas

Cultivo primario de células miometriales humanas.

Las muestras de tejido miometrial humano, fueron obtenidas en el Hospital Pereyra Rossell en colaboración con el grupo dirigido por el Dr. E. Pons (Director de la Clínica Ginecológica A), de pacientes que se someten a histerectomía por indicación médica y de acuerdo con el protocolo previamente aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina. Las edades de las pacientes están incluidas en amplio rango, y se trabajó con pacientes pre y posmenopáusicas. Las células miometriales humanas fueron aisladas de acuerdo con el método descrito por Barata et al 2004. Brevemente, el tejido fue picado en una solución Salina Balanceada de Hans (HBSS), conteniendo 10 mM de glucosa y 10 mM HEPES (pH 7.4). Luego el tejido fue suspendido en HBSS fresco, ventilado con 95% O₂, 5 % CO₂, e incubado en un baño de agua a 37° C sacudiéndolo suavemente cada 15 minutos por 2 hs en presencia de 20 U/ml papaina y 2000 U/ml DNasa. Posteriormente, el tejido fue incubado 2 hs adicionales a 37 °C, con la adición de 1 mg/ml colagenasa tipo IV.

Las células fueron liberadas por trituración, centrifugadas y suspendidas en medio básico de células de músculo liso (SmBM, Clonetics CC 3181, soldthrough BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD) conteniendo 5% de suero fetal bovino (FBS), 100U / litro de Penicilina, 100g /litro de Estreptomicina. 0.05 mg/ml de insulina, y 5ng/ml de factor epitelial de crecimiento humano. Los cultivos celulares fueron mantenidos en frascos de 75cm² conteniendo medio DMEM, 10% de FBS, 100 U / l PEN, 100 µg/L STERP, 0.5 µg /ml FUN y se colocó en una incubadora humedecida con 95%O₂ y 5% de CO₂.

Mientras que la composición del cultivo primario es heterogénea y posee una fracción de crecimiento variable (que depende del tipo de células presentes en el mismo), luego de la realización del primer sub-cultivo, aumenta la homogeneidad celular y su fracción de crecimiento es generalmente mayor (80% o más). A partir del cultivo primario de miometrio humano, se obtiene una monocapa celular de la cual se realizan los sub-cultivos.

Para realizar los mismos, se debe remover el medio y desprender las células del sustrato con tripsina, (0.25% tripsina y 5 mM EDTA). Esta técnica se denomina pasaje del cultivo celular. En el caso de cultivo de células miometriales humanas, se realiza hasta el pasaje 10, ya que después del mismo se ha descrito una disminución en la adhesión de las células al sustrato con cambios celulares a nivel fenotípico (Barata *et al*; 2004).

El total de las células obtenidas de esta forma, mostró tinción positiva para α actina de músculo liso (Imunocitoquímica) y respuesta a oxitocina (transiente de Ca^{2+}) que se midió utilizando Fluo3-AM como será explicado posteriormente.

Medidas de viabilidad

El concepto de viabilidad alude a la capacidad de una célula para realizar sus procesos fisiológicos y bioquímicos. Sin embargo, en la práctica el término es relativo, pues se utiliza con diversos criterios, por ejemplo es común que se hable de viabilidad refiriéndose simplemente a la integridad de la célula (Luque Cabrera. J *et al*; 2001).

Recuento de células viables por incorporación de un marcador.

Se realizó un conteo celular utilizando la cámara de Neubauer y se obtuvo en un frasco de 75 cm² un total de 8 millones de CMH. Luego del mencionado recuento se realizó un método de exclusión tal como la incorporación de yoduro de propidio al cultivo celular. Este compuesto se caracteriza por ser un fluorocromo que se intercala en los ácidos nucleicos, incrementando sensiblemente su fluorescencia. Su estructura aromática plana favorece su inserción entre los pares de bases apilados del ADN, posee propiedades fluorescentes al ser excitados con la luz UV emitiendo luz visible.

La membrana de las células vivas no permite su paso al interior del citoplasma, de manera que únicamente teñirá las células que tengan dañada su membrana (muertas) y los núcleos aislados emitiendo una fluorescencia intensa de color rojo que se visualiza en el microscopio de epifluorescencia (Luque Cabrera. J *et al*; 2001). Para medir la viabilidad celular de las CMH utilizamos este

método, y se comprobó en nuestro cultivo que más del 90% de las CMH estaban viables.

2.2 Métodos utilizados para la caracterización de las proteínas

Western Blot

La inmunotransferencia también llamada Western Blot se realiza para detectar e identificar proteínas presentes en una muestra. Para ello son sometidas a electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE), en la cual son disueltas en un detergente aniónico denominado dodecil sulfato de sodio (SDS) y se realiza en condiciones de reducción usando 2- α -mercaptoetanol. Este método permite separar a las proteínas en función de su tamaño (peso molecular), luego son transferidas a una membrana para su identificación.

La detención de las bandas proteicas en la membrana se realiza gracias a la unión específica de un anticuerpo contra la proteína o región proteica que se quiere estudiar. (Luque Cabrera. J et al, 2001).

Sistema de detección con fosfatasa alcalina

El mejor sistema de sustrato para la visualización de anticuerpos secundarios conjugados a fosfatasa alcalina es la mezcla de 5-bromo-4 cloro indoxil fosfato (BCIP) y nitro azul de tetrazolio (NBT). Este método evidencia la proteína de interés por el depósito de un precipitado color violáceo. La reacción se da a pH alcalino. (Cooper G.M; 2000)

Sistema de detección por Quimioluminiscencia

Este procedimiento es utilizado con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa. La peroxidasa es utilizada para oxidar el luminol en presencia de peróxido de hidrógeno. El luminol queda en un estado excitado que decae al estado basal mediante la emisión de luz. La luz emitida, es detectada mediante la colocación de la membrana en contacto con un film de rayos X con una sensibilidad apropiada. (Cooper G.M, 2000).

2.3 Detección de CaMKIV por Western Blot y Quimioluminiscencia en cultivos primarios de CMH.

Preparación de la muestra y Western Blot

Las células miometriales humanas fueron mantenidas en cultivo con cambio periódico del medio hasta llegar al 80% de confluencia. Luego se suprimió del medio el Suero Fetal Bovino por 24 horas y las mismas fueron tratadas con o sin TNF α (50 ng/ml) por 24 horas. A continuación las células fueron removidas de los frascos de cultivo por tripsinización (2 minutos) y centrifugadas a 1500 g por 15 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet conteniendo las células, fue resuspendido en PBS + 1 mM PMSF (inhibidor de proteasas). Las muestras fueron sonicadas (3 veces por 5 segundos) y la concentración de proteína fue cuantificada por el método de Bradford (Bradford, 1976). La muestra obtenida fue colocada inmediatamente en buffer de muestra (constitución del buffer 1 X: 0.6 M Tris-HCl, 2% SDS, 10% Glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, 0.002% Azul de bromofenol, pH 6.8). Se sembraron 50 μ g de la proteína total de las células del miometrio y 1 μ g de cerebro de rata homogeneizada, las que se corrieron en SDS-PAGE (10% de acrilamida). Se usaron marcadores de pesos moleculares estándares (Bio-Rad). Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF (polyvinylidene difluoride), 0,45 micras (Millipore) por 75 minutos a 300 mA.

Detección de Proteínas

Las membranas se incubaron durante 1 hora en buffer de bloqueo (20 mM Tris (pH 7,3), 150 mM NaCl, 0.1% de Tween 20 (detergente), y en 5% de leche en polvo sin grasa (TBS-T + 5% leche en polvo). Posteriormente, se incubaron durante toda la noche a 4 ° C, con anticuerpo policlonal de conejo anti-CaMKIV (Cell Signalling, C-4032) con una dilución de 1:800 en buffer de bloqueo. Las membranas se lavaron cuatro veces con TBS-T y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con HRP-linked anti-conejo IgG (Cell Signalling) diluido 1:2000 en buffer de bloqueo. Después de cinco lavados con TBST, las bandas

inmunorreactivas fueron detectadas por el sistema de detección de quimioluminiscencia (ECL plus, de Amersham-GE Healthcare). A continuación, las membranas fueron presentadas con papel de plástico y expuestas a películas de rayos X (medical X-film 100NIF). Las placas fueron procesadas con revelador Kodak D19 y fijadas con fijador G334 (AGFA). La intensidad de las bandas se cuantificó con densitómetro usando el programa Image J (NIH, de descarga gratuita).

2.4 Determinación del ARNm de CD38 en CMH por PCR semi-cuantitativo.

Extracción del ARN

Para la preparación de ARN todas las soluciones empleadas deben tratarse previamente con inhibidores de ARNasas. Estos se incluyen durante la preparación de la muestra. El protocolo básico consiste en el tratamiento del homogeneizado de la muestra con disolventes orgánicos. (Fenol, cloroformo o ambos), seguido de agitación vigorosa y centrifugación. El ARN aparece en la fase acuosa superior, a partir de ella se obtiene el ARN por precipitación con etanol. Las muestras fueron tratadas o no (control) por 24hs con TNF α como se menciona anteriormente. Para la extracción de ARN fue utilizado el Kit TRI REAGENT SIGMA y seguidas las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Lectura en el Espectrofotómetro

Para verificar que el ARN obtenido por este protocolo esté libre de ADN y proteínas se realizó la lectura por espectrofotómetro. La relación de la absorbancia 260/280 $\geq 1,7$, fue considerada como indicador de una extracción buena del ARN. Las muestras que tuvieron esta relación, fueron utilizadas para la realización de la transcripción reversa (RT)

Integridad del ARN

Antes de realizar la RT se verificó la integridad del ARN que se obtuvo, realizando una electroforesis en gel de Agarosa al 1 % con Bromuro de Etidio para la visualización de los ARN ribosomales. Se cargo en cada carril con 20µl del ARN obtenido y 5µl de loading buffer 5x. Las bandas correspondientes a los ARN ribosomales fueron observadas utilizando un transiluminador, verificando así la integridad de la muestra.

Eliminación del ADN genómico

La muestra de ARN fue incubada con el buffer de digestión de ADN por 10 min a 42°C, Dicho buffer es eficaz para remover el posible ADN genómico que se encuentre contaminado la muestra.

RT-PCR: Amplificación de ARNm

El nombre “PCR con Transcripción inversa” implica que se trata de amplificación de ARNm a través de la síntesis previa de su ADNc (ADN complementario al ARN) que después se amplificara por PCR. Es el método con mayor capacidad de detección de los disponibles para la medida de la expresión génica *in Vitro*.

Trascrición Reversa

La mezcla inicial contiene todos los componentes necesarios: muestra de ARN, transcriptasa inversa, ADN polimerasa, primers y dNTPs.

Se realizó la trascrición reversa a partir de 1µg de ARN con el Kit de QIAGEN QuantiTect Reverse Transcripción. Este sistema digiere químicamente el posible ADN contaminante que pueda estar presente el la muestra de ARN, evitando el paso de incubación con ADNasas para evitar la posible contaminación. Como cebadores se uso una mezcla de oligo- dT y “randon primers”. Brevemente el proceso comienza con la síntesis de una hebra de ADNc por la acción de la transcriptasa inversa, una polimerasa de ADN dirigida

por ARN permaneciendo el ADNc unido al molde como dúplex ARN: ADNc. En una segunda etapa se desnaturaliza el dúplex (2min a 94°C) y comienza la amplificación según el mecanismo de una PCR normal, la hebra de ADNc liberada actúa como molde para una segunda hebra de ADNc y luego el dúplex se amplifica en sucesivos ciclos. (Luque Cabrera. J *et al*; 2001)

El nivel de la expresión de las moléculas de ARN y el rendimiento relativamente bajo de la reacción del RT deben ser considerados al calcular la cantidad apropiada de molde para llevar a cabo el PCR. El volumen de la reacción de RT no debe exceder el 10% del volumen total del PCR.

Amplificación in-Vitro del ADNc: reacción en cadena polimerasa (PCR)

Una vez realizada la transcripción inversa, obtenemos ADNc que será amplificado por PCR. El objetivo básico de la PCR es amplificar el ADN. Esta no es una técnica analítica *per se*, sino más bien una metodología, resultante de la aplicación práctica de tres conceptos:

Desnaturalización del ADN para dar hebras sencillas.

Hibridación específica de la hebra sencilla con un oligonucleótido, también denominada templado. Esta etapa explica porque para amplificar ADN necesariamente tenemos que conocer parte de la secuencia.

Replicación de la hebra sencilla por una ADN polimerasa a partir del oligonucleotido llamada etapa de polimerización.

Mediante la aplicación en forma cíclica de estos tres procesos se consiguen múltiples copias del fragmento de ácido nucleico en un corto espacio de tiempo.

Reactivos que se precisan en la mezcla de la reacción:

Los cuatro dNTPs, en exceso, para ser reconocidos por la polimerasa deben ir acompañados por Mg^{2+} , dos oligonucleótidos de cadena sencilla. En este caso se usaron sintéticos, sus secuencias han de ser complementarias a los dos extremos 3' de la región diana, uno en cada hebra. Una ADN polimerasa termoestable, es decir enzimáticamente activa a temperaturas relativamente altas (al menos 75°C con frecuencia hasta 95°C). La enzima más empleada se llama *Taq Polimerasa*, por proceder de la bacteria *Thermus aquaticus* (Luque Cabrera. J *et al*; 2001).

Etapas del proceso

Cada ciclo de una PCR consta de tres etapas:

Desnaturalización

Es la etapa que se produce a una temperatura entre 68 y 97°C, aquí se produce la separación de las dos hebras de ADN.

Templado: (o hibridación)

Se produce el enfriamiento rápido de forma que se permite la hibridación de las hebras sencillas de ADN de interés con los oligos. Esta temperatura generalmente es de 37 a 65°C.

Elongación (o replicación)

Esta es la etapa de amplificación propiamente dicha la temperatura, esta entre 72 a 75°C. La replicación transcurre en dirección 5'-3' a partir del extremo 3'-OH de cada cebador, empleando como sustrato los cuatro DNTPs (Luque Cabrera. J *et al*; 2001).

Rendimiento:

Puesto que los productos de cada ciclo sirven de molde para el siguiente, la acumulación de copias es exponencial en vez de lineal.

Condiciones del PCR utilizadas para detectar ARNm de CD38 en CMH

El PCR se realizó bajo las siguientes condiciones, para una reacción: MgCl₂ 25mM, DNTP 200µM, Buffer 10 X, TaQ polimerasa 0,25U, Primers concentración final 0,2-0,1µM, Agua y ADNc 2µl en un volumen final de 20µl por reacción.

Condiciones del Termociclador:

Según las condiciones del trabajo realizado por el grupo de Kannan del departamento de Medicina, Universidad de Philadelphia, Pennsylvania, USA PCR: 94°C por 3 minutos para desnaturalizar, 40 ciclos de 94°C por 30seg, annealing 54°C por 30 seg., 72°C por 45 seg y extensión final 72°C por 10 min. Primers para CD38 Humano:

Primers para CD38 humano *Forward* 5-TTGGGAACTCAGACCGTACCTTG-3 y *Reverse* 5-CACACCATGTGAGGTCATC-3 (Kang Bit-Na *et al*; 2006). Los productos de PCR de 149 pb se observan en un gel de poliacrilamida al 6% con tinción con nitrato de plata.

2.5 Medidas de Ca²⁺ intracelular en una única CMH, en respuesta a oxitocina

Para realizar las medidas de Ca²⁺ intracelular en las CMH, utilizamos el fluoróforo de Ca²⁺ fluo 3 AM de acuerdo como descrito en Benech et al, 2005. Se retiró el medio de cultivo de las CMH contenido en placas de petri de 2,5 cm de diámetro. Luego se lavó 3 veces con Buffer Kreb (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,6 mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 6 mM glucosa, 10 mM HEPES) .Las células fueron incubadas por 30 minutos a 37°C con 5 µM fluo 3 AM. El fluo 3 AM es un ester sin carga eléctrica, siendo capaz de difundir a través de la membrana plasmática celular. Una vez dentro de la célula, los grupos ester son enzimáticamente hidrolizados, generando la forma ácida del compuesto que se puede unir al calcio y que no puede difundir hacia el exterior de la célula. Luego de la incubación con fluo 3 AM, se lavó 3 veces con Buffer Kreb para retirar el resto de fluo 3 AM que no ingresó a las células.

Las medidas de Ca²⁺ intracelular, fueron realizadas en 2 equipos diferentes, 1) Microscopio Confocal y 2) Microscopio de epifluorescencia invertido acoplado a un fotomultiplicador. En el primer caso, el Microscopio Confocal fue programado para obtener imágenes de una única célula cada 5 segundos. El experimento fue iniciado obteniendo imágenes en ausencia de oxitocina. Luego se adiciono al medio 1 µM de oxitocina (concentración final) y se obtuvieron imágenes por 1 minuto. En el segundo caso, el experimento fue

realizado de la misma forma, pero la señal correspondiente al aumento de la señal de fluorescencia del fluo3 fue obtenida cada 10 milisegundos utilizando un microscopio de epifluorescencia acoplado a un monocromador, un fotomultiplicador y computadora con los software necesarios para determinación de Ca^{2+} libre intracelular de acuerdo como descrito en Benech et al 2000. El fluo 3 fue excitado a 488 nm y la emisión registrada a 530 nm.

2.6 Microscopía láser confocal

La microscopía láser confocal es una nueva técnica de observación microscópica que está logrando excelentes resultados en diversas ramas de la ciencia (medicina, biología, materiales, geología, etc.). Su éxito se debe a las indudables ventajas que ofrece frente a la microscopía óptica tradicional (imágenes de mayor nitidez y contraste, mayor resolución vertical y horizontal, etc.) y, sobre todo, a la posibilidad de obtener "secciones ópticas" de la muestra, lo que permite su estudio tridimensional

El principio de la microscopía confocal se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco (figura 1). Para ello se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces procedentes de los planos inferiores y superiores (Boyde A, 1988).

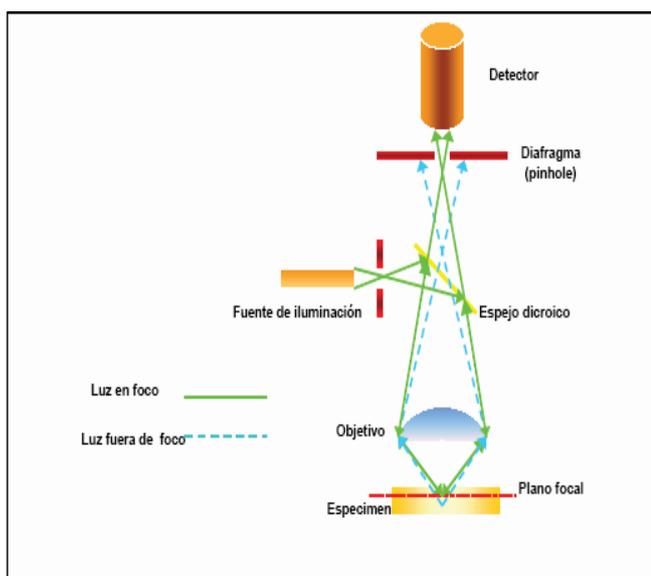


Figura 1: esquema del principio de microscopía confocal.

El principio del funcionamiento del microscopio confocal se basa en la existencia de dos diafragmas (*pinhole*), uno entre la fuente de luz y el objetivo y el otro entre el objetivo y el detector. Ambos *pinhole* deben de estar perfectamente alineados de forma que el segundo de ellos únicamente deje llegar al detector la luz procedente del plano focal. La utilización de un láser como fuente de luz permite focalizar la iluminación en una región muy pequeña de la muestra y con una gran intensidad.

Al iluminarse una pequeña zona se necesita para su visualización sistemas de barrido. El sistema de barrido puede ser de dos tipos: que el haz del láser se desplace por la muestra (*beam scanning*) o que sea ésta la que se desplace, mientras el haz permanece inmóvil (*stage scanning*) (Wright, *et al*; 1993).

La luz reflejada o fluorescencia emitida por la muestra es recogida en un fotomultiplicador donde se transforma en una señal de vídeo que se digitaliza y almacena en una computadora, visualizándose a través de un monitor.

Ventajas de La Microscopia Confocal

Son muchas las ventajas que se obtienen a partir de esta microscopia. Solo se nombran algunas de ellas.

Mayor resolución.

Para un objetivo de inmersión en aceite con una apertura numérica de 1.4 y una longitud de onda de 442 nm es posible alcanzar resoluciones de 0.14 μm en horizontal y 0.23 μm en vertical (Wilson, 1990).

Mayor contraste.

Debido a que se elimina la luz procedente de las zonas fuera de foco.

Posibilidad de realizar secciones ópticas.

Variando el plano de enfoque el sistema es capaz de tomar imágenes a diferente profundidad. Esto permite obtener información tridimensional de la muestra.

2.6.1 Inmunocitoquímica y Microscopia láser confocal

Preparación de la muestra:

Las células miometriales humanas, fueron cultivadas sobre vidrio y mantenidas en cajas de petri de 2.5 cm de diámetro en medio de cultivo tal como se explicó anteriormente. Cuando las células alcanzaron 80% de confluencia, el suero fetal bovino se suprimió por 24 horas. Posteriormente las células fueron tratadas o no (control) con 50 ng/ml de TNF α por 24 horas. A continuación el medio fue removido y las células lavadas con PBS. Luego se preparó fijador (paraformaldehído al 3 % en PBS), se procedió a la fijación de las células por 20 minutos a 4 °C. Se lavó 3 veces con PBS para sacar el resto del fijador. Las células contenidas en los vidrios fueron colocadas en solución de bloqueo (TBST conteniendo 5% de BSA) por 1h a temperatura ambiente. A continuación, las células fueron incubadas toda la noche con o sin anticuerpos primarios (controles). Los anticuerpos primarios que se utilizaron, fueron para CD38: el anticuerpo monoclonal anti-CD38 (SC7325-FITC; Santa Cruz Biotechnology) con una dilución 1:100 y para CaMKIV se utilizó anticuerpo policlonal hecho en conejo anti-CaMKIV (Cell Signalling, C-4032) con una dilución de 1:800.

Luego las células fueron lavadas 5 veces con TBST cada 5 minutos y tratadas para CaMKIV con el anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado a Alexa 488 (Molecular Probes) y para CD38 se utilizó el anticuerpo secundario anti-cabra conjugado a Alexa Fluo 546. Ambos se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Las imágenes láser confocal fueron obtenidas en un microscopio Olympus Fluoview F300, utilizando lentes Olympus UplanF1 40x 0.75 AN.

3. Resultados

3.1 Caracterización del cultivo celular primario de células miometriales humanas

El cultivo primario de las células miometriales humanas fue obtenido a partir de muestras normales de miometrio humano de acuerdo a como fue descrito en el capítulo de materiales y métodos. Como forma de caracterizar el cultivo obtenido, se realizó la incubación del mismo con el anticuerpo anti- α actina, que reconoce específicamente la isoforma de α -actina que se encuentra presente en el músculo liso. El total de las células obtenidas de esta manera, mostró tinción positiva para α actina de músculo liso (Figura 1).

Por otra parte, como forma de corroborar que las células obtenidas estaban funcionales, verificamos la respuesta de las mismas a oxitocina. La respuesta a esta hormona, se ha reportado positiva, para cultivos de células miometriales obtenidas por este método (Barata *et al*; 2004). Como fue mencionado anteriormente, los ROXT, actúan acoplados a varias proteínas G (Sanborn, 2007), produciendo un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. La figura 2, muestra la respuesta de una única célula tratada con oxitocina ($1\mu M$) (obtenida por microscopía láser confocal) y previamente incubada con Fluo 3 AM de acuerdo a como fue descrito en materiales y métodos.

En la Figura 3 se observa la respuesta de una única célula (previamente incubada con Fluo 3 AM) a la oxitocina, utilizando un microscopio invertido de epifluorescencia acoplado a un monocromador y a un fotomultiplicador como descrito en materiales y métodos. En ambas figuras se observa un aumento en la concentración de Ca^{2+} en respuesta a la oxitocina tal como era esperado

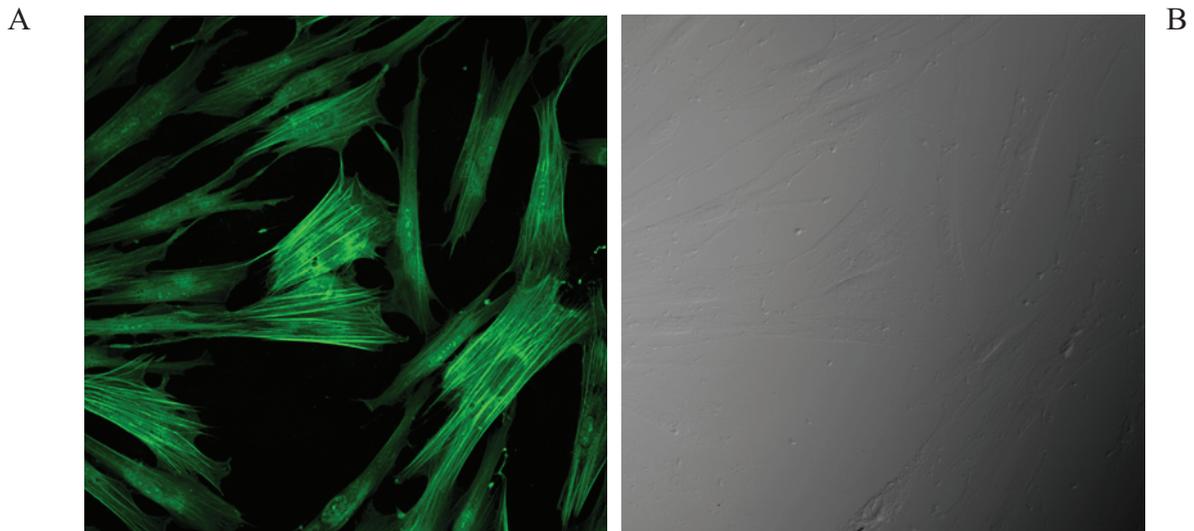


Figura 1.

A) Inmunofluorescencia de CMH incubadas con el anticuerpo anti- α actina, que reconoce específicamente la presencia de la isoforma de α -actina que se encuentra presente en el músculo liso (40X). B) Imagen de luz transmitida mismo campo visual (40X)

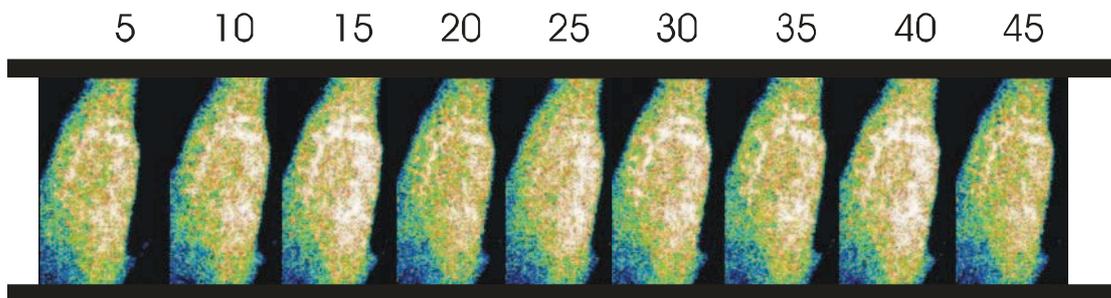


Figura 2.

Respuesta de una única célula (previamente incubada con Fluo 3 AM) a la oxitocina ($1\mu\text{M}$). Imágenes adquiridas como se explicó en materiales y métodos por microscopía láser confocal.

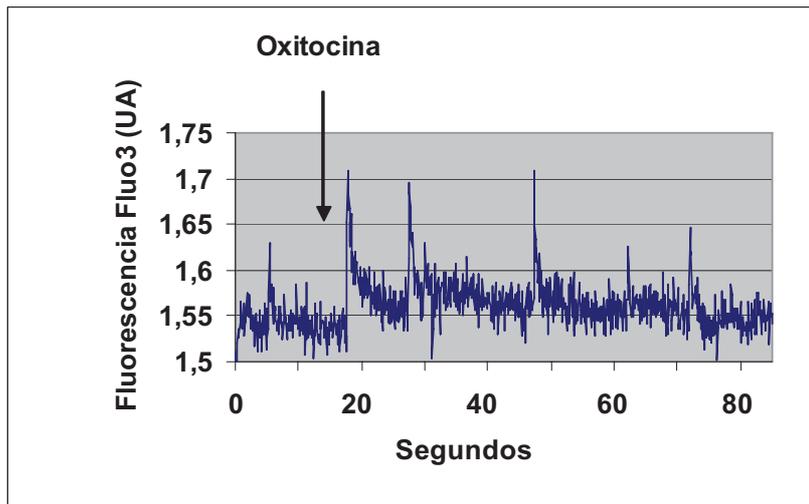


Figura 3.

Respuesta de una única célula (previamente incubada con Fluo 3 AM) a la oxitocina, utilizando un microscopio invertido de epifluorescencia acoplado a un monocromador y a un fotomultiplicador

3.2 Efecto del TNF α en la expresión de la proteína CD38 en células miometriales humanas.

En la figura 4 se observan imágenes tomadas con microscopia láser confocal de un ensayo de inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo anti-CD38 en CMH. Este anticuerpo reconoce la isoforma de CD38 presente en tejidos humanos (Barata *et al*; 2004). La figura 4 A, muestra la señal de fluorescencia obtenida de los ensayos inmunocitoquímicos en CMH tratadas con TNF α en comparación con la figura 4B de CMH sin tratar. La especificidad de la señal obtenida fue buena, dado que la señal de fluorescencia obtenida en los ensayos inmunocitoquímicos en ausencia del anticuerpo primario fue muy baja (4C). La localización celular de la proteína fue de preferencia perinuclear y la señal fue más acentuada en CMH que han sido tratadas con TNF α , siendo estos resultados concordantes con los descritos previamente por Barata et al, (2004).

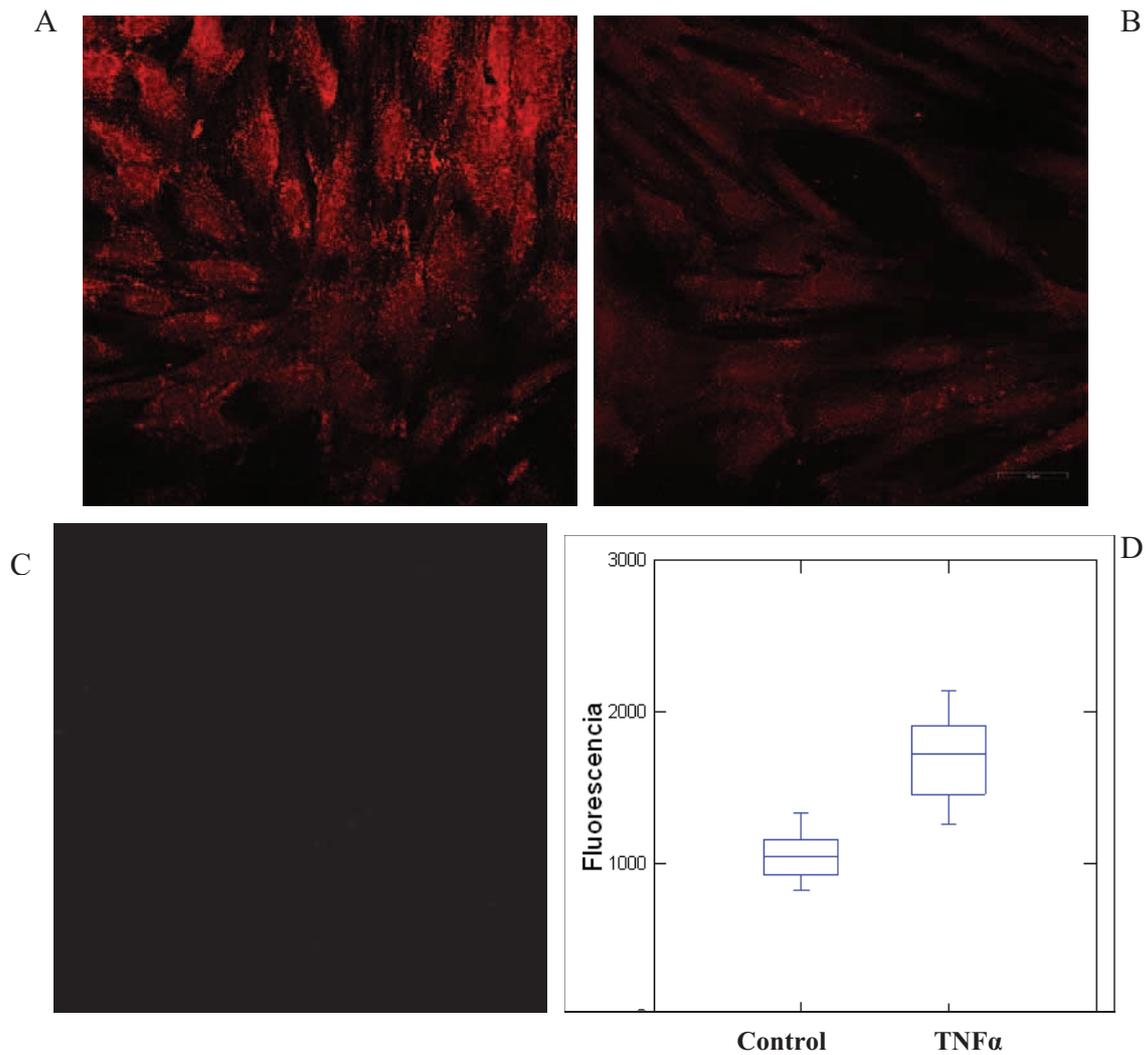


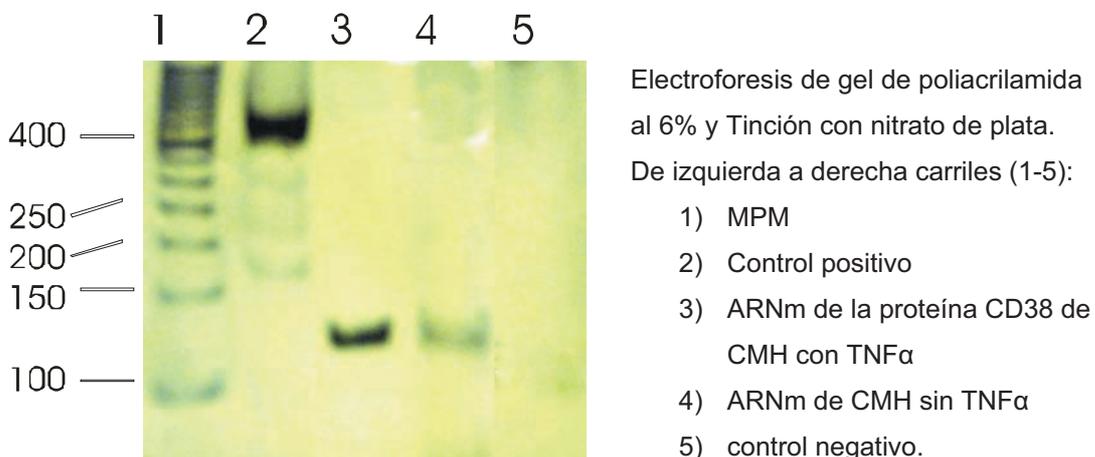
Figura 4

A- Señal de fluorescencia obtenida de los ensayos inmunocitoquímicos con el anticuerpo anti-CD38 en CMH tratadas con TNF α . B- CMH sin tratamiento con TNF α . C- Control CMH solo con anticuerpo secundario D-Cuantificación de la señal de fluorescencia, los datos mostrados en la cuantificación de la fluorescencia, se analizaron por test de Student's. y corresponden a la señal de fluorescencia proveniente de 20 células en cada condición experimental (con o sin TNF α) obtenidas de 3 experimentos independientes ($p = 0,000$).

3.3 Efecto del TNF α sobre el nivel de transcripción del ARNm de CD38 en células miometriales humanas.

Ha sido previamente publicado, que el tratamiento de células miometriales humanas (Barata, *et al*; 2004) así como el tratamiento de músculo liso de vías aéreas humanas (Kang Bit-Na *et al*; 2006) con TNF α , promueve un aumento en la transcripción de CD38. En la figura 5 se observa el resultado del RT-PCR utilizando primers específicos para reconocer el ARNm de CD38 humano proveniente de CMH con o sin tratamiento con TNF α . En los carriles 3 y 4 de la mencionada figura, se observa una única banda de aproximadamente 149 pb. De acuerdo a los primers utilizados (Kang Bit-Na, *et al*; 2006), este sería el tamaño esperado del ARNm a ser reconocido. La intensidad de la banda observada del carril 3 (CMH tratadas con TNF α), es mayor a la observada en el carril 4 (CMH sin tratamiento). Cuando el ADN copia fue omitido (control negativo), no se observa ninguna banda (ver carril 5 de la figura 5). El conjunto de estos resultados, sugieren que el ARNm de CD38 aumenta en CMH tratadas con TNF α como ya fuera descrito por otros autores

Figura 5



3.4. Detección y localización de CaMKIV en células del miometrio humano.

Utilizando un anticuerpo específico que reconoce todas las isoformas de CaMKIV que se expresan en forma endógena, detectamos la presencia de esta proteína en los cultivos de células miometriales humanas Figura 6. Las imágenes de microscopía láser confocal, indican una distribución preferentemente nuclear de esta proteína.

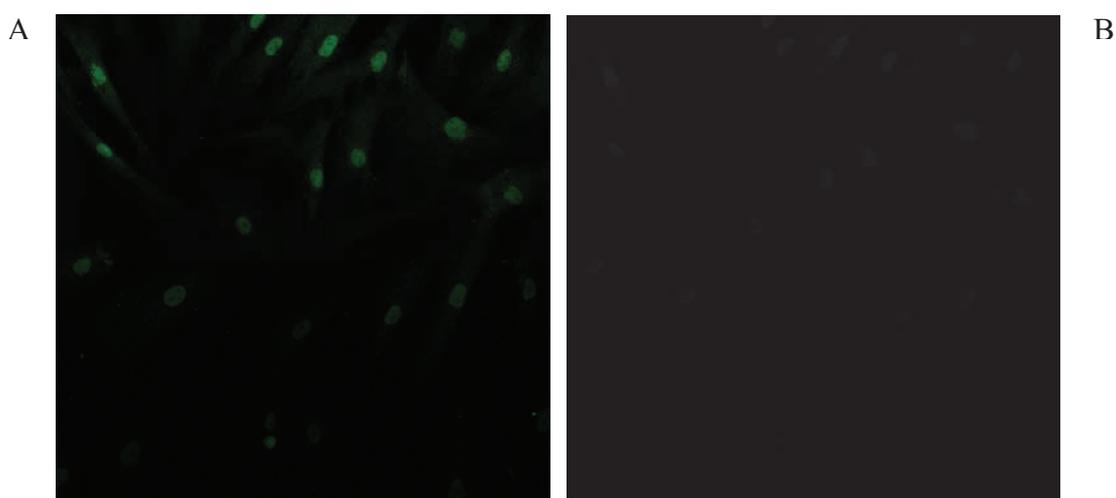


Figura 6

A-Señal de fluorescencia obtenida de los ensayos inmunocitoquímicos con el anticuerpo anti-CaMKIV en CMH. B- Control, CMH solo con anticuerpo secundario.

3.5. Efecto del TNF- α sobre la expresión de CaMKIV en CMH

En la figura 7, se muestran imágenes tomadas con microscopía láser confocal de un ensayo de inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo anti-CaMKIV como fue descrito en materiales y métodos de CMH con o sin tratamiento con TNF α (A y B). La cuantificación de la señal de fluorescencia (7 C), mostró que la señal de fluorescencia fue significativamente mayor (más del doble) en las células tratadas con TNF α en comparación con las controles. El aumento en la expresión de CaMKIV promovido por TNF- α , fue corroborado por western blot (Quimioluminiscencia) (Fig. 8).

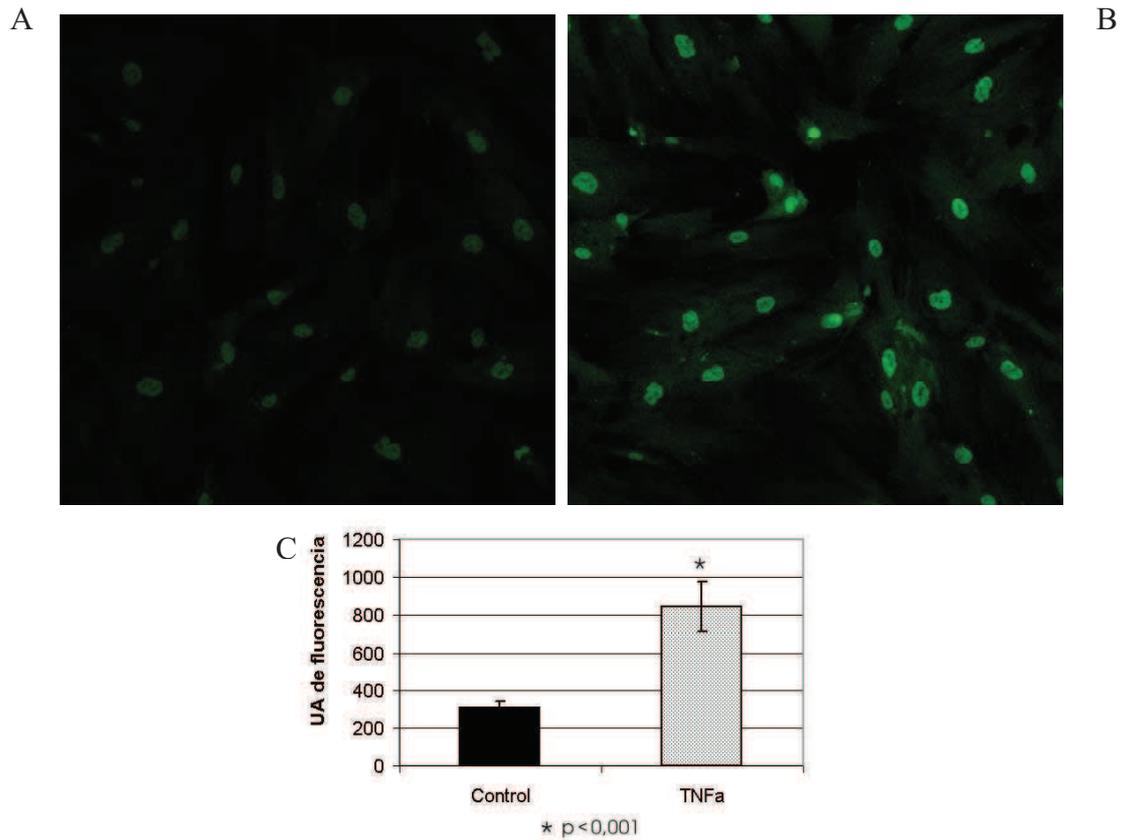


Figura 7

Imágenes tomadas por microscopia láser confocal, el tratamiento con TNF α promueve aumento en la expresión de CAMKIV en CMH en cultivo. A -CMH sin tratamiento. B -CMH tratadas con TNF α . C- Cuantificación de la señal de fluorescencia, los datos mostrados en la cuantificación de la fluorescencia, se analizaron por test de Student's. y corresponden a la señal de fluorescencia proveniente de 15 células en cada condición experimental (con o sin TNF α) obtenidas de 3 experimentos independientes ($p < 0,001$)

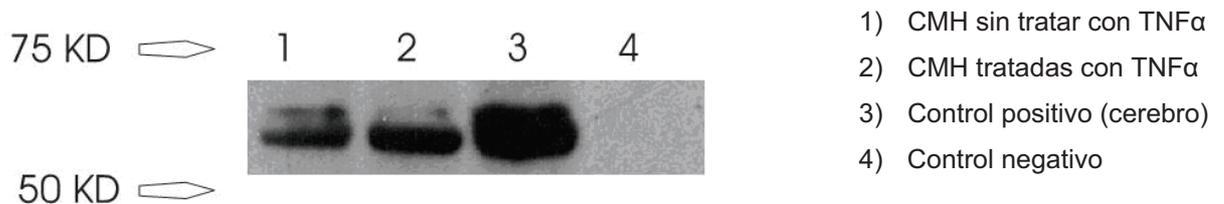


Figura 8

Western blot (Quimioluminiscencia)

4. Discusión y Conclusiones

En el presente trabajo pudimos caracterizar el modelo del cultivo primario de células miométriales humanas basados en el trabajo de Barata et al, 2004 con algunas modificaciones de nuestro grupo de trabajo. Constatamos la presencia de α -actina de músculo liso por inmunocitoquímica láser confocal en la totalidad de las células observadas en cada campo del microscopio (figura 1). Por otra parte, demostramos la funcionalidad de las células obtenidas, ya que respondieron a la adición de 1 μ M de la hormona oxitocina, con un aumento en la concentración del Ca^{2+} intracelular como fue mencionado en varios trabajos de la literatura especializada (Figuras 2 y 3), confirmando que contamos con un cultivo primario de células miométriales humanas funcionales.

Como fue mencionado anteriormente, en el miometrio, una interacción compleja de segundos mensajeros intracelulares está relacionado con la homeostasis de la concentración de Ca^{2+} intracelular y la contracción de la musculatura uterina (Lynn *et al*, 1993; Martin *et al*, 1999; Sanborn, 2000; Tribe, 2001; Young and Zhang, 2001; Young and Mathur, 1999). La liberación de Ca^{2+} del RS juega un rol importante en la señalización del miometrio humano (Burghardt *et al*, 1999; López-Bernal, 1995; Sanborn, 2000; Tribe, 2001). Dos sistemas intracelulares de liberación de Ca^{2+} han sido caracterizados en el miometrio humano, el sistema dependiente de IP_3 y el sistema dependiente de receptores de ryanodina (RyR). Sin embargo, solamente la vía de señalización por receptores de IP_3 ha sido estudiada con relativa profundidad (Phillipe and Chien, 1998). La vía de la ADP-ribosa cíclica ha sido poco estudiada. La ADP-ribosa cíclica (ADPRc) es un nucleótido que se encuentra en forma natural y existen evidencias claras de que la misma está involucrada en la regulación de las propiedades de los mecanismos de disparo del receptor de ryanodina (RyR). En tejidos de mamífero, este nucleótido es metabolizado por CD38 (una enzima bi-funcional capaz de sintetizar e hidrolizar ADPRc), (Chini and Toledo, 2001; Dousa *et al*; 1996). Por lo tanto, ADPRc es un candidato importante a segundo mensajero para regular los RyR en miometrio humano.

La capacitación del miometrio quiescente para el trabajo de parto, es un evento complejo que ocurre en varias semanas (Sanborn, 2000; Tribe, 2001). Con la aproximación del término del embarazo, una variedad de genes que codifican

para proteínas asociadas a la contracción (CAP-contraction-associated proteins) son activados. Los RyR han sido implicados como parte de CAP en el miometrio humano (Tribe, 2001). Durante los diferentes periodos del embarazo, la expresión de las isoformas de RyR es diferencial, tipo 3 en el miometrio con y sin embarazo y tipo 2 solamente en el miometrio proveniente de muestras con embarazo (Taggart and Wray, 1998). La señal que induce un estímulo en la expresión de CAP es muy compleja e incluye esteroides placentarios como el estrógeno y citoquinas proinflamatorias como IL-1 y TGF- β (Tribe, 2001).

Como hemos mencionado anteriormente en el proceso del trabajo de parto, el patrón de producción de citoquinas es alterado y la producción de citoquinas pro-inflamatorias es favorecida comparada con las anti-inflamatorias (López-Bernal, 2001; Slattery and Morrison, 2002). Las citoquinas proinflamatorias más destacadas para dicho rol son, IL-1 β , IL-6, IL-8, así como TNF α . En el miometrio humano ha sido observado que el aumento de TNF α favorece la estimulación de la actividad uterina (Gogarten *et al*; 2003). Trabajando con cultivos primarios de células miometriales humanas, hemos verificado que el tratamiento de los mismos con TNF- α por 24 horas, aumentó la expresión de CD38 y de su ARNm (Figuras 4 y 5 respectivamente). Nuestros resultados coinciden con los resultados publicados por Thompson, M *et al*, 2004 y Barata, H *et al* 2004, quienes postulan un rol importante de las citoquinas proinflamatorias en la preparación del miometrio para el trabajo de parto, regulando la vía de la ADP-ribosa cíclica por regulación de la transcripción y expresión de la enzima CD38. Los trabajos mencionados anteriormente, han mostrado que TNF- α aumenta los transientes de Ca²⁺ inducidos por oxitocina en las CMH y que este aumento es abolido bloqueando la expresión de la enzima CD38 utilizando ARN de interferencia (Thompson, M *et al*; 2004 y Barata, H *et al*; 2004).

Otra proteína involucrada en la homeostasis de calcio es la proteína quinasa Ca²⁺ / Calmodulina dependiente CaMKIV. La unión de Ca²⁺ produce un cambio conformacional en la calmodulina (CaM), formándose así el complejo Ca²⁺/CaM. Este interacciona mediante la exposición de sus residuos hidrofóbicos con numerosas proteínas, promoviendo la regulación de sus funciones. Muchos de estos complejos modulan vías de señalización celulares, cuyos blancos son proteínas estructurales, canales iónicos, factores de transcripción y numerosas

enzimas (Carafoli *et al*; 2002). Entre las proteínas de señalización reguladas por el complejo Ca^{2+} / CaM se encuentra la familia de proteínas-Kinasas con residuos de ser /thr conocidas como CaM-kinasas (CaMKs). Estas son particularmente abundantes en el cerebro y se activan mediante su unión al complejo Ca^{2+} / CaM, produciendo la fosforilación en sus residuos ser/thr alterando su función (Wayman *et al*; 2008).

Como se mencionó anteriormente CaMKIV pertenece a la familia de proteínas-Kinasas. Existen evidencias que implican a CaMKIV participando en la modulación de la plasticidad sináptica a nivel cerebral, a través de la formación del complejo CaMKK-CaMKIV-CREB, dicha cascada de señalización se ha visto implicada en el condicionamiento al miedo a nivel cerebral (Wayman *et al* ;2008).

En nuestro trabajo, hemos podido detectar la presencia de CaMKIV en el cultivo de CMH (Figuras 6 y7). Como fue dicho anteriormente, dos miembros de esta familia de enzimas se expresan en el músculo liso: la CaMKII y la CaMKIV (Cartin *et al*; 2000). Mientras que en el músculo esquelético CaMKIV no se expresa endógenamente, si lo hace CaMKII (Bassel-Duby y Olson, 2006). En forma coincidente con lo observado en otros tipos de tejido (cerebro, linfocitos, células germinales), hemos observado una localización preferentemente nuclear de CaMKIV en las CMH. Hasta donde sabemos, nuestro trabajo es el primer trabajo en constatar la presencia de esta proteína en cultivo primario de células miometriales humanas. Es importante resaltar, que logramos detectar también la proteína, en cortes de tejido miometrial humano obtenidos de las muestras de miometrio utilizadas para obtener el cultivo celular (datos no mostrados). Esta aclaración es importante, pues indica que la proteína ya era expresada por el músculo liso miometrial originalmente. La activación de CaMKIV por Ca^{2+} , ha sido asociada con la activación del factor de transcripción CREB por fosforilación, el que posteriormente estimula la expresión de varios genes c-fos (Wamhoff *et al*; 2006; Tremper-Wells y Vallano, 2005; Hook and Means, 2001).

Además de constatar la presencia de CaMKIV en los cultivos de CMH, hemos observado que el tratamiento con TNF- α de las mismas, promovió también un aumento en la expresión de CaMKIV. Este aumento fue constatado por dos metodologías diferentes: a) inmunocitoquímica laser confocal (Fig.7) y b)

inmunoblot (Fig.8). Los resultados del inmunoblot presentados en este trabajo, son resultados preliminares que actualmente estamos confirmando.

En resumen, hemos constatado que la incubación de las células miometriales humanas con TNF- α , promueve un aumento en la transcripción y expresión de CD38. Por otra parte, hemos constatado la presencia de CaMKIV en las CMH y que el mismo tratamiento con TNF- α promueve también un aumento en la expresión de esta proteína.

Una reciente revisión sobre la dinámica del calcio a nivel del miometrio (Sanborn, 2007) sugiere que las CaMKs junto a otras proteínas kinasas podrían modular la respuesta al calcio. Sin embargo, a la fecha, la expresión de estas proteínas Kinasas en el miometrio y su posible función en la regulación génica y activación de otras enzimas son desconocidas.

Nuestros resultados sugieren que las citoquinas pro-inflamatorias podrían estar alterando una serie de componentes que hacen parte de las vías de señalización por Ca²⁺ como lo son CD38 y CaMKIV. La proteína CD38 estaría directamente involucrada en potenciar la señal de Ca²⁺ y CaMKIV muy posiblemente en la activación y modulación de la expresión génica.

Datos preliminares obtenidos por nuestro grupo indican un aumento de la expresión de CaMKIV en cortes de útero de ratas al término de su preñez normal (inmediatamente post-parto) comparado con cortes de útero de ratas vírgenes o ratas en su primer tercio de gestación. En base a estos resultados, podemos sugerir que CaMKIV podría estar implicada en los cambios funcionales del miometrio durante el parto. El hecho de que los resultados obtenidos “in vitro” (el presente trabajo) coincida con resultados observados en condiciones fisiológicas “in vivo” refuerza los resultados aquí obtenidos.

5- Referencias Bibliográficas

Barata H., Thompson M., Zielinska W., Han Y. (2004). The Role of Cyclic-ADP-Ribose-Signaling Pathway in Oxytocin; Induced Ca^{2+} Transients in Human Myometrium Cells, *Endocrinology*, 145:881–889.

Bassel-Duby y Olson., (2006). Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 75: 19-37.

Benech, J.C., Escande, C., Sotelo, J.R., (2005). Relationship between RNA synthesis and the Ca^{2+} filled state of the nuclear envelope store. *Cell Calcium*, v. 38 2, p. 101-109.

Benech, J. C., Lima, P.A., Sotelo, J.R., Brown, E. R., (2000). Ca^{2+} dynamics in synaptosomes isolated from the squid optic lobe. *Journal of Neuroscience Research*, v. 62 6, p. 840-846.

Bo L ., Hill S. J., and Khan .R.N., (2005). Oxytocin Inhibits T-Type Calcium Current of Human Decidual Stromal Cells, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90:4191–4197.

Boyde, A. (1988). Confocal optical microscopy. *Microscopy and analysis*, 7-13.

Burghardt R.C., Barhoumi .R., Sanborn and Andersen .J., (1999). Oxytocin-Induced Ca^{2+} Responses in Human Myometrial Cells, *Biology of Reproduction* 60, 777–782.

Burgoyne R.D., Petersen O.H., (1997). Landmarks in intracellular signaling Ed. Pórtland Press Ltd. Cap 9.

Carafoli E. (2002). Calcium signaling: A tale for all seasons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99:1116-1122.

Carafoli E. (2005) Calcium a universal carrier of biological signals, *FEBS. J* 272: 1073-1089.

Cartin L., Lounsbury K.M and. Nelson M.T ., (2000). Coupling of Ca²⁺ to CREB Activation and Gene Expression in Intact Cerebral Arteries from Mouse: Roles of Ryanodine Receptors and Voltage-Dependent Ca²⁺ Channels, *Circulation Research*, Vol 86; 760-767.

Chini E.N and Toledo F., (2001). The new calcium-mobilizing nucleotides cyclic ADP-ribose and NAADP. In: Pandalai SG, ed. *Developments in biophysics and biochemistry*. Trivandrum, India: Research Signpost; 43–57.

Cooper G.M., (2000). “The cell: A Molecular Approach” Second Edition, sinauer Associates, Inc., Sunderland, Missachusett.

Coronado R., Morrissette J., Sukhareva M., Vaughan D.M., (1994). Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol* 266:1485–1504.

Dogan S., Deshpande D., White T., Walseth T., Kannan M., (2006). Regulation of CD 38 expression and function by steroid hormones in myometrium. *Mol Cell Endocrinol* ; 246:101–6.

Dousa T.P., Chinni E.N., Beers W.K., (1996). Adenine nucleotide diphosphates: emerging second messengers acting via intracellular Ca²⁺ release. *Am J Physiol* 271:1007-24.

Galione A., White A., (1994). Ca²⁺ release induced by cyclic ADP ribose. *Trends Cell Biol Physiol* 271:C1007-24.

Galione A and Churchill G.C., (2002). Interactions between calcium release pathways: multiple messengers and multiple stores. *Cell Calcium* 32:343-354.

Grandi. C., (1996) El rol de la infección en la etiología del parto. Revision de literatura, *Rev. Hosp. Mat. Inf. Ramón Sardá* 1996, XV, N° 2, 78-86.

Gogarten W., Lindeman K.S., Hirshman C.A., and Emala C.W., Tumor Necrosis (2003). Factor Alpha Stimulates Adenylyl Cyclase Activity in Human Myometrial Cells, *Biology Of Reproduction* 68:751–757

Hook .S and Means. R., (2001) Ca^{2+} /CaM-DEPENDENT KINASES: From Activation to Function, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* Vol. 41: 471-505.

Kang Bit-Na ., Tirumurugaan K. G., Deshpande D.A., Amrani Y., Panettieri R.A, Walseth T.F and Kannan M.S., (2006). Transcriptional regulation of CD38 expression by tumor necrosis factor- α in human airway smooth muscle cells: role of NF- κ B and sensitivity to glucocorticoids, *The FASEB Journal* 20:E170-179.

Kuemmerle J.F and Makhlof G.M., (1995). Agonist-stimulated cyclic ADP ribose. Endogenous modulator of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in intestinal longitudinal muscle. *The Journal of Biological Chemistry* 270:25488–25494.

Lee H.C., (1997). Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol.Rev* 77: 1133-1164.

Lobo F.M., Zangani R., Ho .N., Chatila A and Fuleihan R., (1999). Calcium-Dependent Activation of TNF Family Gene Expression by Ca^{2+} /Calmodulin Kinase Type IV/Gr and Calcineurin, *The Journal of Immunology*, 162: 2057-2063.

López-Bernal ., Rivera .J., Europe-Finner GN., Phaneuf S., Asbóth G., (1995). Parturition: activation of stimulatory pathways or loss of uterine quiescence? *Adv Exp Med Biol* 95: 435-51

López-Bernal and Frances Moore., (2001). Myosin light chain kinase and the onset of labour in humans, *Experimental Physiology* 86: 313–318.

López-Bernal.,(2007) Overview. Preterm labour: mechanisms and management *BMC Pregnancy and Childbirth* 7(Suppl 1): 1186-1471.

Luque Cabrera J y Herráez Sánchez., (2001) Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética Conceptos, *Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud. Primera Edición.*

Lynn S., Morgan M., Gillespie J., Greenwell., (1993). A novel ryanodine sensitive calcium release mechanism in cultured human myometrial smooth-muscle cells, *FEBS* 330: 227-230.

Martin C., Chapman K., Thornton S and Richard H., (1999). Ashley Changes in the expression of myometrial ryanodine receptor mRNAs during human pregnancy. *BBA* 1451: 343-352.

Michaelis E .K ., (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiology* 54:369-415.

Mikoshiha K., Furuichi T., Miyawaki A., (1994). Structure and function of IP3 receptors. *Semin Cell Biol* 4:273-81.

Ministerio de salud Publica, Programa de Salud de la Niñez www.msp.gub.uy

Najwer and Lilly (2005), Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV activates cysteine-rich protein 1 through adjacent CRE and CArG elements, *Am J Physiol Cell Physiol* C785-C793,

Phillippe M and Chien E.K, (1998) Intracellular signaling and phasic myometrial contractions, *J Soc Gynecology Investing*, 4:169-77.

Prakash Y. S., Kannan M.S., Walseth T. F., and Sieck G. C., (1998) Role of cyclic ADP-ribose in the regulation of [Ca²⁺]_i in porcine tracheal smooth muscle, *Am J Physiol Cell Physiol*, 274:1653-1660.

Sanborn B.M., (2000) Relationship of ion channel activity to control of myometrial calcium, *J Soc Gynecology Investing* Jan-Feb; 1: 4-11.

Sanborn B.M., (2007) Hormonal signaling and signal pathway crosstalk in the control of myometrial calcium dynamics, *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18: 305–314.

Slattery M and Morrison J (2002) Preterm delivery. *The Lancet*, 360: 1489-1497

Taggart. J and Wray .S, (1998), Contribution of sarcoplasmic reticular calcium to smooth muscle contractile activation: gestational dependence in isolated rat uterus, *J Physiol.* 133–144

Thompson M., Barata H., Zielinska W., White T., Bailey J.P., Lund F.E., Sieck G.C and Chini E.N (2004) Role of CD38 in myometrial Ca²⁺ transients: modulation by progesterone, *AJP - Endo* 287:1142-1148,

Tremper-Wells .B and Vallano. M (2005), Nuclear Calpain Regulates Ca²⁺ dependent Signaling via Proteolysis of Nuclear Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Type IV in Cultured Neurons, *The journal of biological chemistry* ,Vol. 280, pp. 2165–2175, 2

Tribe R.M., (2001) Regulation of human myometrial contractility during pregnancy and labour: are calcium homeostatic pathways important? *Experimental Physiology* 86: 247–254.

Wayman G.A., Lee Yong-Seok, Tokumitsu H., Silva A and Soderling T.R (2008) Calmodulin-Kinases: Modulators of Neuronal Development and Plasticity. *Neuron* , 59: 914–931.

Wamhoff, B., Bowles .D., Owens. G., (2006). Excitation–Transcription Coupling in Arterial Smooth Muscle, *Circ. Res*; 868-878.

Wilson .T., (1990). Confocal Microscopy, *Academic Press*, 486-93.

Wright S.J., Centezzone V. E., Stricker S. A., DeVries P.J., Paddock S. W., Schaten G., (1993). Introduction to Confocal Microscopy and Three-Dimensional Reconstruction. *Cell Biological Applications of Confocal Microscopy*. 38:1-45.

Young R.C., Mathur S.P., (1999). Focal sarcoplasmic reticulum calcium stores and diffuse inositol 1, 4, 5-trisphosphate and ryanodine receptors in human myometrium, *Cell Calcium* 26:69–75.

Young R.C., Zhang P., (2001). The mechanism of propagation of intracellular calcium waves in cultured human uterine myocytes. *Am J Obstet Gynecol* 184:1228–1234.

Young A., Thomson A.J., Ledingham M., Jordan F., (2002). Immunolocalization of Proinflammatory Cytokines in Myometrium, Cervix, and Fetal Membranes during Human Parturition at Term, *Biology of Reproduction* 66: 445–449.

Zhou X., Lutz S., Steffens F., Korth M., Wieland T.,(2007). Oxytocin receptors differentially signal via Gq and Gi proteins in pregnant and nonpregnant rat uterine myocytes: implications for myometrial contractility. *Mol Endocrinol* 21:740–52.

1/8/2009



LICENCIATURA
EN BIOLOGÍA
HUMANA

TIEMPO DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN VISUAL SEMÁNTICA EN SERES HUMANOS

Tutor: Angel Caputi, Laboratorio: Neurociencias
Integrativas y computacionales

Marcela Piffaretti

AGRADECIMIENTOS

. A la UDELAR, que nos recibe a todos, a los docentes con oficinas de puertas abiertas y a los de 'me pueden encontrar en la cantina si tienen dudas;' a la gente en bedelía por su buena disposición y esfuerzo para que las cosas salgan bien; a la gente en portería que me cuidaban el grabador cuando no podía ir a los teóricos y a todas las personas, muchos ahora amigos muy queridos, con intereses y pasiones tan diversas con las que he tenido el gusto de cruzarme a lo largo de la carrera.

. A todos quienes forman parte del Laboratorio de Neurociencias Integrativas y Computacionales, por la buena onda, los aportes y las ideas.

. A mi tutor Angel Caputi, por recibirme, escucharme y decirme que era posible, por su paciencia eterna, su tiempo y su exigencia.

. A todas aquellas personas-familiares, amigos, vecinos y perfectos desconocidos- que se ofrecieron para hacer los experimentos (contrario a lo que sugiere la bibliografía, de forma totalmente desinteresada).

. A mis padres, por sus mil maneras de apoyarme y alentarme a seguir mi vocación.

. A Juanjo, mi compañero de ruta, por acompañarme con un 'si se puede' a lo largo de la carrera y por tratar de hacerme todo más fácil.

. A Juanfe, nuestro regalo de la vida, por sus sonrisas al volver a casa y a Pau Francisco, que desde la panza me recuerda lo vulnerable, misteriosa y maravillosa que es nuestra biología humana.

RESUMEN

Durante la pasantía colaboré en desarrollar una técnica de exploración del tiempo de reacción aplicable a poblaciones. Utilizando dicha técnica se confirmó la existencia de un tiempo cognitivo de aproximadamente 200 ms, presente al realizar una tarea que implica decidir cuándo una imagen presentada corresponde a un concepto. Dicho tiempo es similar al obtenido por otros autores y, a diferencia del tiempo de reacción simple, no es afectado significativamente por la calidad de la imagen ni por la edad de los participantes. Los resultados obtenidos utilizando un “priming” (léxico y vocal) al inicio del experimento no difieren significativamente de los resultados obtenidos con un “priming” léxico inmediatamente antes de la presentación de la imagen de prueba. Adicionalmente se observó mayor dispersión de los resultados de dicha prueba. Interpretamos este resultado como vinculado al cansancio resultante de la mayor dificultad atencional de la prueba. Por último se comparó la performance en la identificación de imágenes naturales con la identificación de palabras escritas con una clave inmediata previa, no encontrándose diferencias significativas en el tiempo obtenido. Se discutirá el rol del cansancio en dicha tarea.

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

“At some point between gazing and thinking images must give way to ideas”

S.Pinker

¿Cuánto tiempo le lleva a un ser humano identificar una imagen? y una palabra? ¿Cómo es afectado este tiempo por la edad? y por la calidad de la imagen? Estas preguntas no son nuevas pero aún son motivo de investigación y discusión en este siglo. Con el desarrollo de nuevas tecnologías ha sido posible obtener respuestas cada vez más refinadas y a su vez generar preguntas cada vez más complejas. Fueron estas las preguntas que guiaron el presente trabajo. Se buscó desarrollar una técnica que pudiera ser sacada fuera del laboratorio, para poder trabajar con poblaciones. Comparamos los resultados generados con los obtenidos por otros autores y vimos que es posible su utilización. Luego de generada y probada la técnica, surgieron nuevas preguntas y se comenzaron a explorar y a discutir otras posibles aplicaciones. De aquí surgen muchos elementos a mejorar, pero creemos que es un camino que vale la pena recorrer y continuar explorando.

Arquitectura y procesamiento visual

El sistema visual es capaz de extraer representaciones razonablemente constantes sobre la forma de objetos y caras a pesar de diferencias en posición, tamaño o iluminación (Farah, et al. , 1999). La información visual que llega a la retina hace un relevo en el núcleo geniculado lateral del tálamo antes de llegar a la corteza estriada, área V1. Es en el trayecto entre la corteza occipital a la corteza temporal visual que la representación del estímulo atraviesa las transformaciones más radicales de las propiedades de la imagen hacia las propiedades intrínsecas del objeto. (Farah, et al. , 1999) . El reconocimiento de un objeto se procesa en una vía de procesamiento ventral que pasa por V2, V4 y las partes posterior y anterior de la corteza inferotemporal (Thorpe, 2002). La corteza inferotemporal (IT) representa aspectos de la forma intrínseca del estímulo que son útiles para el reconocimiento y omite los aspectos de la apariencia del estímulo que dependen de condiciones tales como tamaño, luminancia y orientación (Farah, et al. , 1999).

Si bien el sistema es distribuido, la correlación anatomo-funcional es clara para algunas tareas. Por ejemplo, se sabe que las neuronas en la corteza inferotemporal pueden ser altamente selectivas a estímulos de caras y que dichas neuronas pueden responder apenas 80-100ms luego de la presentación del estímulo (Thorpe, 2002). Se ha demostrado que el comienzo de la respuesta neural de neuronas selectivas para caras puede ser completamente selectivo, lo que argumenta a favor de un modo de procesamiento feed-forward rápido (Bacon-Macé, et al., 2007).

Existe evidencia de que hay distintas vías corticales implicadas cuando la tarea visual implica reconocimiento de objetos (vía ventral del “qué”) o cuando implica acciones direccionadas hacia un objetivo (vía dorsal del “dónde”) (Bacon-Macé, et al., 2007). La vía dorsal involucra el análisis de las ubicaciones de los objetos y sus movimientos en el espacio. La vía ventral es responsable del procesamiento y almacenamiento de información sobre la identidad de los objetos: su forma, color y otras características físicas destacables (Farah, et al. , 1999). Existen actualmente dos marcos alternativos sobre el funcionamiento de la arquitectura funcional de la vía ventral. En el marco propuesto por Gauthier et al., 1998, 1999, la región llamada área fusiforme facial (FFA) se especializa, no en el procesamiento de caras en sí mismo sino en el procesamiento de objetos con los que uno ha adquirido experiencia. En este sentido existen dos interpretaciones. Una de ellas sugiere que la activación de la vía ventral está basada en características visuales. Otra interpretación enfatiza los procesos asociados con la percepción o reconocimiento de objetos. Según esta interpretación, la vía ventral contiene áreas que se adaptan mejor a distintas computaciones, que pueden ser reclutadas cuando se adquiere experiencia con determinados tipos de objetos visuales. Esto puede implicar la codificación de diferencias sutiles entre objetos visualmente similares o la búsqueda de similitudes subyacentes entre objetos visualmente poco similares. Por otra parte, según otro marco alternativo, propuesto por Ishai et al., 1999 y Haxby et al., 2001, la arquitectura funcional de la vía ventral no está compuesta por regiones específicas para categorías, sino que contiene una representación distribuida de información sobre la forma del objeto. Cada categoría está asociada con su propio patrón de respuesta a través de la corteza temporal ventral con un arreglo espacial altamente consistente entre sujetos. Según este marco la representación de un objeto no está restringido a una región que responde de forma

máxima a ese objeto, sino que se encuentra distribuida a lo largo de una expansión mayor de la corteza (Pessoa, L. et al., 2008).

Si bien el procesamiento no es necesariamente secuencial, pueden definirse etapas asociadas a la activación de distintas estructuras durante el proceso de categorización (Figura 1). Al pasar por cada etapa aumentan las latencias de respuesta, los campos receptivos se vuelven mayores y las neuronas se vuelven selectivas para formas visuales cada vez más complejas (Thorpe, 2002). En monos las distintas áreas corticales en la vía ventral comparten determinadas características fisiológicas. Todas las áreas de la vía contienen poblaciones de células sensibles a la forma, color o textura del estímulo visual o alguna combinación de estas características. Se aprecian cuatro tendencias fisiológicas principales al avanzar a lo largo de la vía. En primer lugar, la naturaleza de la representación del campo visual cambia desde un mapa preciso del campo visual contralateral a un mapeo más difuso del espacio visual en general. Segundo, existe un aumento en el grado en que se señalizan características particulares del estímulo, tales como un borde orientado adecuadamente, sin importar su ubicación exacta en la retina. En tercer lugar existe una tendencia hacia la selectividad por características del estímulo cada vez más complejas o combinaciones de características, yendo de selectividad para dimensiones simples tales como orientación de los bordes y longitud de onda en V1 a la preferencia por objetos complejos, incluyendo estímulos biológicamente significativos tales como rostros y movimientos corporales mostrados por muchas neuronas en las etapas finales de la vía ventral. Finalmente, al progresar en la vía ventral hacia el lóbulo frontal, hay un aumento en el grado en que las células aportan información relacionada con cuán recientes y cuán familiares sean los objetos. Tanto en humanos como en monos los circuitos de procesamiento de caras parecen estar localizados en módulos relativamente pequeños. Esto puede reflejar una tendencia más general de la neocorteza mamaliana de desarrollar módulos específicos para categorías para clases de estímulos comportamentalmente importantes (Farah, et al., 1999).

Evans y Treisman (2005) propusieron que mientras el procesamiento inicial puede ser suficiente para determinar si hay un animal presente, la identificación detallada y localización puede requerir de un procesamiento adicional basado en la atención. La posibilidad de que mecanismos relativamente simples puedan ser suficientes para por lo menos algunas formas de tareas visuales a niveles superiores ha sido apoyada por un número reciente de estudios. Grill-Spector y Kanwisher (2005) encontraron que la identificación más precisa de objetos requiere de tiempo de procesamiento adicional. Macé y sus colegas encontraron que los tiempos de reacción en tareas "go/no-go" eran menores para juicios de categorías más generales (animal vs. no animal) que para categorías más específicas (perro vs. no perro). Es de pensar que existen límites para los tipos de procesamiento que pueden ser alcanzados de un modo pre-atencional (Bacon-Macé, et al., 2007).

En un estudio en el que se examinó la respuesta de las neuronas de la corteza inferotemporal al presentar secuencias de imágenes de modo rápido se encontró que incluso al presentar las imágenes a 72 marcos por segundo las neuronas IT emiten un "blip" de activación significativo cada vez que se presenta el estímulo preferido de dicha neurona (Thorpe, 2002). Estos resultados implican que el sistema visual es capaz de realizar una especie de procesamiento en tubo o cañería, con sólo 14 ms

disponibles por imagen. Se podrían estar procesando 7 imágenes distintas simultáneamente en los distintos niveles del sistema visual (Thorpe, 2002).

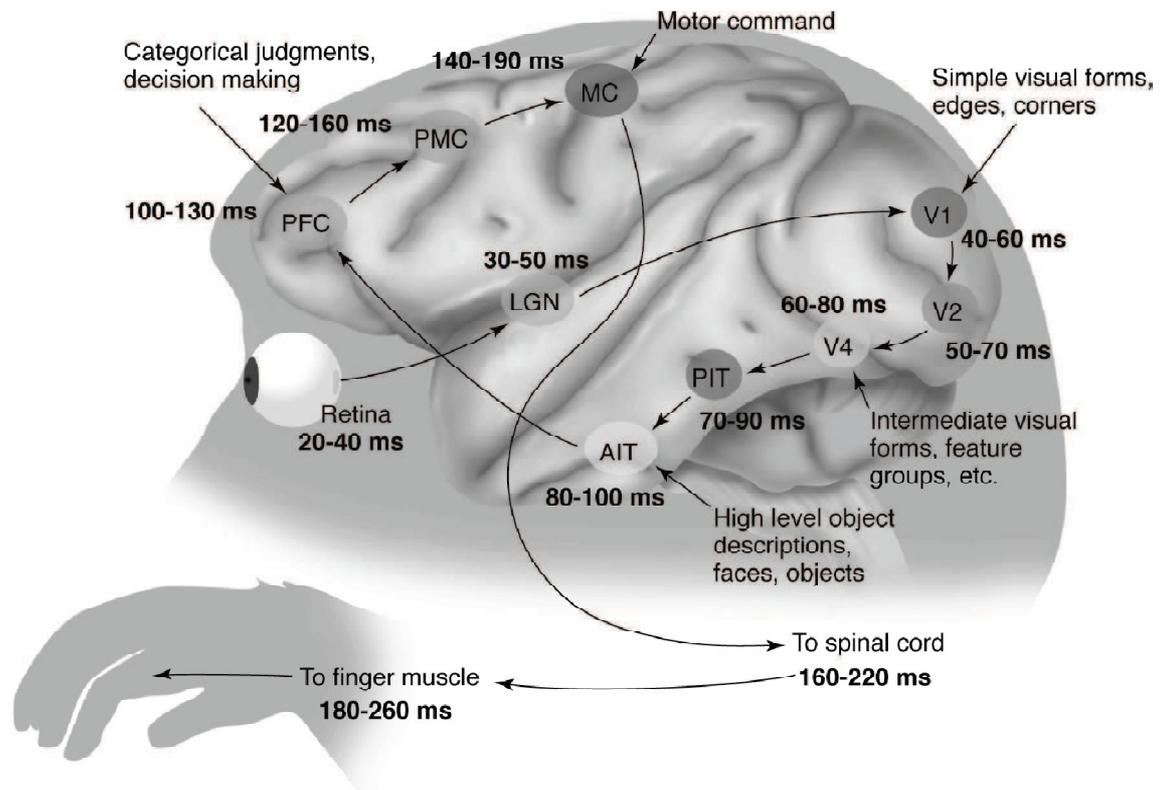


Figura 1. Una posible vía para la realización de tareas de categorización en monos. La información pasa de la retina al núcleo geniculado lateral (LGN) antes de llegar al área cortical V1. El procesamiento posterior ocurre en V2, V4 y en la corteza inferotemporal posterior y anterior (PIT y AIT). La información es relevada a las cortezas prefrontal (PFC), premotora (PMC) y motora (MC). Finalmente, la activación de las motoneuronas en la médula dispara el movimiento de la mano. Para cada área los números brindan valores aproximados de latencia para (i) las respuestas más tempranas y (ii) una respuesta promedio típica (de Thorpe y Fabre-Thorpe, Science, 2001).

De acuerdo a las teorías de cronometría mental la performance en tareas “go/no-go” depende de una secuencia de procesos que incluyen codificación sensorial del estímulo, almacenamiento de la información en la memoria a largo plazo, toma de decisiones, programación y ejecución de una respuesta motora apropiada (Bacon-Macé, et.al., 2007). En este tipo de tareas, en las que se le solicita al sujeto que presione un botón cuando aparece determinado tipo de estímulo y que no lo haga cuando aparece otro tipo de estímulo, se obtiene un tiempo de reacción de discriminación (TRD). El tiempo de reacción es el tiempo que media entre el inicio del estímulo y la producción de la respuesta y fue medido por primera vez por F. Donders.

El tiempo de reacción simple (TRS) es el tiempo que requiere un observador para responder a la presencia de un estímulo y necesita solamente dos tipos de procedimiento: sensorial (t_s) y motor (t_m). Se puede así estimar la duración de la latencia perceptual (t_p) y de la latencia de decisión (t_d)

TRS (tiempo de reacción simple) = $t_s + t_m$

TRC (tiempo de reacción complejo) = $t_s + t_p + t_d + t_m$

La etapa perceptual corresponde a las actividades de discriminación o de categorización de los dos estímulos. La etapa decisional corresponde a la aplicación de la regla experimental (Bonnet, 1994).

Actualmente existe creciente literatura en electrofisiología e imagenología cerebral que se centra en los procesos neurales que tienen lugar entre la percepción y la acción. A raíz de estos estudios la cascada percepción-decisión-acción ya no es considerada como un sistema secuencial simple sino como un sistema complejo de vías paralelas donde el flujo de información se acumula con el tiempo hasta que se alcanza un umbral decisional que dispara una respuesta motora. A un nivel funcional y anatómico los modelos actuales están más cercanos a un sistema paralelo y asincrónico o distribuido (Bacon-Macé, et.al., 2007). Los hallazgos realizados por Martin et al., 1995 sugieren que la información sobre los distintos atributos de un objeto no se encuentra almacenada de modo unificado en ningún área de la corteza, sino que el conocimiento acerca de los objetos parece estar almacenado de modo distribuido de manera tal que la información sobre atributos específicos es almacenada cerca de regiones específicas de la corteza que median la percepción de dichos atributos (Pessoa, L. et al., 2008).

Procesamiento y categorización rápida de imágenes

En los años 1970s Irving Biederman y Molly Potter demostraron que el ser humano es capaz de tener idea sobre una imagen con sólo una breve mirada. Potter introdujo la técnica de Presentación Visual Secuencial Rápida usando imágenes naturales y demostró que se pueden detectar categorías de objetos en secuencias de objetos presentados hasta 10 marcos por segundo, sin dificultad. Thorpe ha desarrollado una serie de experimentos para estudiar la Categorización Visual Ultra-Rápida (URVC). En dichos experimentos se exhibe brevemente (típicamente por 20 ms) una imagen natural que no había sido vista previamente por el sujeto. Al sujeto se le pregunta si la imagen contiene una categoría determinada, como por ejemplo un animal. La mitad de las imágenes corresponden a la categoría blanco y el resto consta de distractores varios. Aunque los sujetos no tienen idea de qué se les va a presentar: tamaño, orientación o número obtienen un buen desempeño, típicamente de alrededor del 95 % con tiempos de reacción promedio por debajo de 400 ms. Se pudo determinar también un "tiempo de reacción mínimo," definido como el valor del tiempo de reacción más corto para el cuál el número de respuestas a la categoría blanco supera al de respuestas frente a los distractores. Para las tareas de detección de animales este valor se encuentra alrededor de los 250 ms. Se debe tener en cuenta que este valor no sólo incluye el tiempo necesario para el procesamiento visual sino también el tiempo necesario para iniciar y ejecutar la respuesta motora (soltar el botón del mouse). Al registrar la actividad eléctrica cerebral se pudo mostrar que existe una

respuesta eléctrica diferencial que distingue las categorías blanco de los distractores que comienza apenas 150 ms luego de la presentación del estímulo (Thorpe, 2002).

Este tipo de procesamiento visual rápido tiene una serie de propiedades. En primer lugar no requiere visión foveal. Las imágenes pueden ser presentadas aleatoriamente a diferentes eccentricidades sin que ello cause un problema. En segundo lugar, no es necesaria la presencia de color en las imágenes, lo que sugiere un rol mayoritario de las vías magnocelulares en los mecanismos de procesamiento y transmisión subyacentes. Por último, las velocidades de reacción no pueden ser acortadas por la familiaridad con las imágenes estímulo, incluso luego de 3 semanas de entrenamiento intensivo (VanRullen & Thorpe, 2001). La URVC no es específica para categorías biológicas pues el grado de aciertos y el tiempo de procesamiento no varían significativamente cuando la categoría blanco pasa de ser “animales” a “medios de transporte.” Incluso cuando se presentaron dos imágenes simultáneamente a la derecha y a la izquierda del campo visual la velocidad de procesamiento no varió. Estos resultados contribuyen con la idea de que el procesamiento puede ser realizado sin la necesidad de atención visual directa. Li y sus colegas demostraron que se puede realizar otra tarea altamente exigente sin afectar la habilidad de los sujetos de detectar animales en escenas captadas por la visión parafoveal.

En estudios con monos Rhesus se observó que pueden realizar tareas similares exitosamente y que sus velocidades de reacción son sustancialmente menores que las de los humanos (160-180 ms) (Thorpe, 2002).

Categorización Rápida y contraste

Fechner, Thurstone y Stevens fueron los principales autores que propusieron maneras y métodos de medir la sensación y como ésta cambia con la intensidad del estímulo. Pieron (1920) propuso una ley que describe las variaciones del tiempo de reacción simple con la intensidad:

$TR = \beta \cdot I^{-\gamma} + t_0$ donde TR es el tiempo de reacción, β un parámetro de ajuste, I la intensidad del estímulo, γ el exponente y t_0 un tiempo de reacción asintótico (el mínimo posible). La variación tiene la forma de una hipérbola: el tiempo de reacción disminuye cuando la intensidad aumenta. Pero, a partir de una intensidad, el tiempo de reacción se mantiene constante. Este tiempo se denomina cronobase (t_0) (Bonnet, 1994).

Se ha demostrado que existe gran robustez del sistema visual en la categorización de objetos a contrastes muy bajos. En un estudio realizado por Macé *et al.* (2005) se estudió la performance en una tarea de categorización visual rápida, reduciendo el contraste desde un 25 a un 3.1% del nivel inicial. Aunque se observó una disminución en el porcentaje de respuestas correctas al disminuir el contraste, sólo al llegar al nivel de contraste más bajo se alcanzó un nivel de respuestas al azar (49 % de respuestas correctas). En cuanto a la velocidad de reacción, aumentó con cada reducción en el contraste, llegando a un plateau al pasar de N/12 a N/14, N/16 y N/32. Este resultado dio a pensar a los autores que se había realizado el máximo procesamiento de la información disponible y que una mayor demora no sería de utilidad para aportar más evidencia para la toma de una decisión.

Dado que se considera que se necesita un 10% de contraste como el menor valor de contraste necesario para activar las células parvocelulares, los resultados muestran una activación muy baja del sistema parvocelular, sugiriendo que la información podría jugar un rol en funciones de la vía visual ventral tales como el reconocimiento de objetos. La decisión sería tomada en base a una representación temprana del objeto con el fin de realizar la tarea de categorización y los posteriores detalles serían aportados por el sistema parvocelular (Macé, 2005).

En un estudio similar realizado por Legge et al. (1987) con lectura la reducción en el contraste tuvo un amplio efecto en la velocidad y también se aumentó el número de fijaciones oculares necesarios para realizar la tarea.

Memoria semántica, identificación de objetos y símbolos

La memoria semántica es el aspecto de la memoria humana que corresponde al conocimiento general de objetos, significados de palabras, hechos y personas, sin una conexión con un tiempo o lugar en particular. Es mayoritariamente compartida por los individuos de una determinada cultura. Muchos de los contenidos de la memoria semántica se relacionan con la percepción y la acción. Una función central de la memoria semántica es realizar generalizaciones a través de conceptos que tienen un significado semántico similar pero no necesariamente comparten atributos específicos similares (Patterson et al. , 2007). Usando un ejemplo similar al planteado por los autores se puede pensar que distintos tipos de perros presentan distintos colores, tamaños, nombres y modos de moverse, pero desde un punto de vista semántico entran dentro de una misma categoría. Los autores antes mencionados han planteado la hipótesis de que la generalización semántica requiere de un único "hub", o zona de convergencia amodal que se encuentra en el lóbulo temporal anterior. En dicha zona las asociaciones entre distintos pares de atributos, tales como forma y nombre, forma y acción o forma y color son procesadas por un set de neuronas y sinapsis en común, sin importar cuál sea la tarea.

Procesamiento de palabras

Se ha encontrado en la corteza humana un homólogo de la vía ventral para el reconocimiento de objetos a través de tomografías de emisión de positrones y de imagenología por resonancia magnética funcional. Al trabajar con potenciales evocados se observó que los potenciales obtenidos al presentar categorías de objetos se encuentran en las mismas zonas que los obtenidos al presentar palabras y números, sugiriendo que, al menos en niveles iniciales de procesamiento el material lingüístico es tratado dentro del sistema de reconocimiento de objetos (Farah, et al. , 1999).

Desde 1988 existe evidencia aportada por Petersen et al. de la existencia de neuronas que responden selectivamente a las palabras en el lóbulo temporal. Varios modelos proponen que el sistema de lenguaje humano puede considerarse como una especie de red semántica, con nodos que corresponden a palabras, siendo la información almacenada en las conexiones entre los nodos. McClelland y Rumelhart

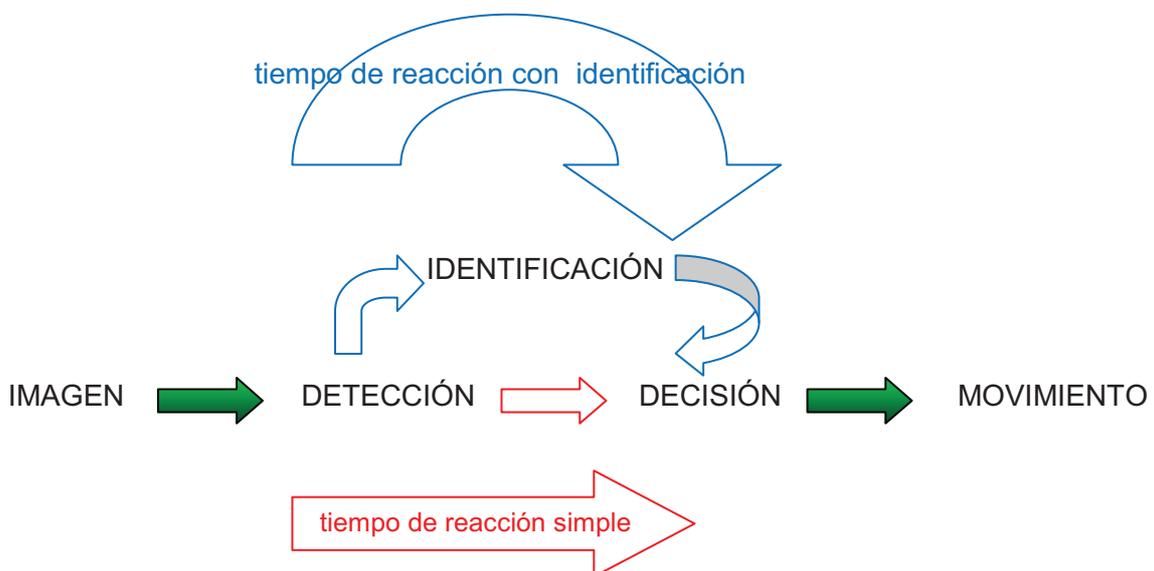
(1981) propusieron un modelo de activación interactiva de identificación de palabras (Thorpe, 1991).

La teoría de jerarquía reversa sobre la percepción de Hochstein y Ahissar (2002) sugiere que cuando observamos una imagen nuestro percepto consciente inicial refleja un procesamiento visual a un alto nivel de la corteza, como puede ser la identidad de una cara o una palabra. La percepción de detalles visuales, como la orientación es más lenta y requiere feedback de los niveles más altos de la corteza. Esta teoría implicaría que características visuales extraídas a niveles corticales mas tardíos, como la identidad de una palabra, son procesadas más rápidamente y tienen una resolución temporal mayor que aquellas que fueron extraídas en niveles anteriores (O Holcombe & Judson, 2007).

Soler et al.(2002) diseñaron una tarea de decisión léxica a los efectos de estudiar el proceso de percepción de palabras. Los participantes debían decidir si una cadena de letras era o no una palabra. Como durante el acceso al léxico las palabras que son más frecuentes se reconocen más rápidamente que las poco frecuentes, el tiempo de reacción a las palabras más frecuentes es inferior al tiempo de reacción a las palabras poco frecuentes. Entonces los autores equipararon la frecuencia léxica a la intensidad del estímulo, ajustando a la función de Pieron los tiempos de reacción de la tarea de decisión léxica (Soler,O. et al., 2005).

Hipótesis y objetivos

En base a lo expuesto anteriormente se plantea el siguiente esquema:

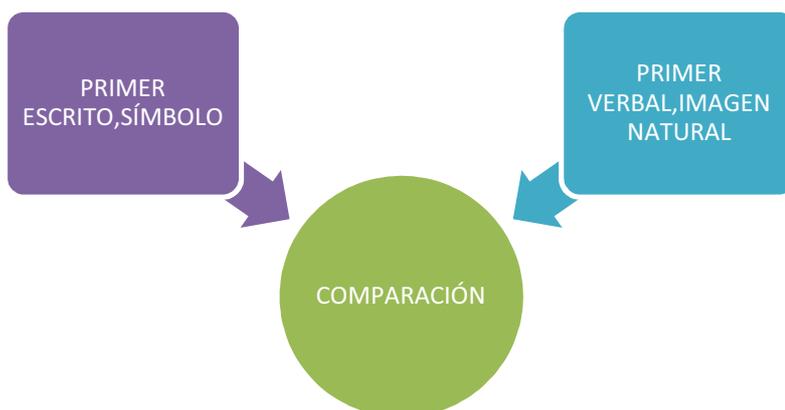


Se encaró el trabajo en 2 etapas: En la primera etapa el objetivo fue mostrar la posibilidad de medir el tiempo de identificación visual con relativa precisión, en forma simple y rápida, y utilizando un computador portable y mostrar que dichas medidas coinciden con las medidas obtenidas por otros autores. Se persiguieron 2 objetivos específicos.

a) El **primer objetivo** de este trabajo fue confirmar la existencia de una diferencia entre el tiempo de reacción simple frente a un estímulo visual y el tiempo de reacción que involucra el reconocimiento de una entidad u objeto natural de visualización frecuente, medirlo aplicando nuestra técnica y comparar dichas medidas con las de la literatura. Llamaremos a esta diferencia **tiempo de identificación visual (TIV)**.

b) Dado que existen diferencias cualitativas entre el tiempo de reacción simple y los tiempos de reconocimiento (dependencia de la edad y de la intensidad o contraste), el **segundo objetivo** fue evaluar los efectos de la edad del individuo y la intensidad (contraste) de la imagen sobre el tiempo de identificación visual.

En una segunda etapa se buscará responder la pregunta sobre cuánto tiempo le lleva a un ser humano procesar una palabra. A los efectos de plantear los objetivos para esta etapa se utilizará el siguiente esquema:



En esta segunda etapa el objetivo fue comenzar a explorar la posibilidad de estudiar las diferencias entre los tiempos de identificación de imágenes naturales e imágenes de símbolos escritos (palabras)" Para ello se persiguieron 2 objetivos específicos:

c) El **tercer objetivo específico** de la pasantía fue explorar cuanto se afecta el tiempo de reacción al comparar el percepto de la imagen de prueba con un concepto almacenado en memorias de trabajo diferente. Evaluar las potenciales diferencias entre estos tiempos es, además de un enlace entre el objetivo de la primera etapa y la segunda, una condición necesaria para la consecución del cuarto objetivo. Para ello se comparó el tiempo de reacción que involucra la identificación de una única entidad determinada al inicio de la prueba con el tiempo de reacción que involucra la identificación de una entidad determinada inmediatamente antes de la presentación de la imagen blanco.

d) El **cuarto objetivo específico** fue comparar el tiempo de reacción que involucra la identificación de una entidad codificada por una imagen natural con el tiempo de reacción que involucra la identificación de una entidad codificada por un símbolo escrito (palabra).

Experimento 1: discriminación de imágenes naturales

El objetivo del presente experimento es obtener el tiempo de identificación visual como la diferencia entre el tiempo de reacción con identificación visual y el tiempo de reacción simple y comparar los datos obtenidos con los obtenidos por otros autores. Se estudiará cómo este tiempo es afectado por la edad y por la variación en la calidad de la imagen.

METODOS

Participantes

Participaron un total de 31 personas (20 de sexo femenino) con edades comprendidas entre los 10 y los 77 años de edad (37,2 en promedio). El promedio de edad de las participantes de sexo femenino fue de 39 años y el de los de sexo masculino de 33,5. Todas tenían visión normal o corregida y manifestaron no sufrir enfermedades neurológicas y no estar ingiriendo medicación. 3 personas eran zurdas. Los participantes realizaron la prueba una única vez. Todos los participantes fueron informados sobre los objetivos del experimento y dieron su consentimiento para participar.

Estímulos

Se elaboró un programa en Matlab 7.0 a través del cual se presentaron en forma aleatoria 5 imágenes de distintos perros y 5 imágenes distractoras (teléfono, gato, elefante, flor, silla). Cada imagen fue seguida de una pantalla gris.

Las imágenes se presentaron en tonos de gris: fueron normalizadas teniendo en cuenta la luminancia, el contraste y la relación señal-ruido para lograr una calidad uniforme.

Se utilizaron las imágenes y sus correspondientes imágenes en espejo para aumentar la variedad de estímulos.

Procedimiento

Se trabajó en una notebook con un mouse externo. Todas las personas usaron la misma máquina. Se midió un error de máquina de 20 ms. En una primera parte del experimento se les solicitó a los participantes que hicieran clic con el botón izquierdo lo más rápidamente posible al percibir que la imagen cambiaba (prueba de detección). En una segunda parte los participantes sólo debían hacer clic al ver la imagen de un perro (prueba de identificación visual).

Análisis de datos

Se obtuvieron las medianas de los tiempos de reacción para ambas condiciones experimentales y se estudió la presencia de correlación entre dichos valores y la edad de los participantes utilizando el test de correlación de rangos de Pearson. Se compararon los resultados obtenidos para la prueba de identificación visual y simple. Las pruebas entre individuos se realizaron con el test de Wilcoxon para muestras independientes (o Mann-Whitney) y las pruebas entre dos resultados producidos por el mismo individuo en condiciones experimentales diferentes se compararon con el test de Wilcoxon para muestras apareadas.

RESULTADOS

En este experimento se obtiene el tiempo de reconocimiento o identificación visual, con valores similares a los obtenidos por otros autores. Se descarta, para esta población la existencia de correlación entre dicho tiempo y la edad de los participantes.

La primera condición experimental (prueba de detección) consiste en hacer clic con el mouse cada vez que la imagen cambia y en la segunda condición (prueba de identificación visual) únicamente al ver un perro. Se registraron los tiempos para ambas pruebas.

El promedio de las medianas de los tiempos de reacción en la prueba de detección fue de 359 ms y el de la prueba de identificación visual fue de 562 ms. Por lo tanto la diferencia, es decir el tiempo de reconocimiento, fue de 204 ms en promedio. En la figura 2 se muestran las gráficas obtenidas para 25 participantes de los tiempos obtenidos en la prueba de detección y de identificación visual y en la figura 4 el promedio de los tiempos obtenidos, con un límite de confianza de 95%.

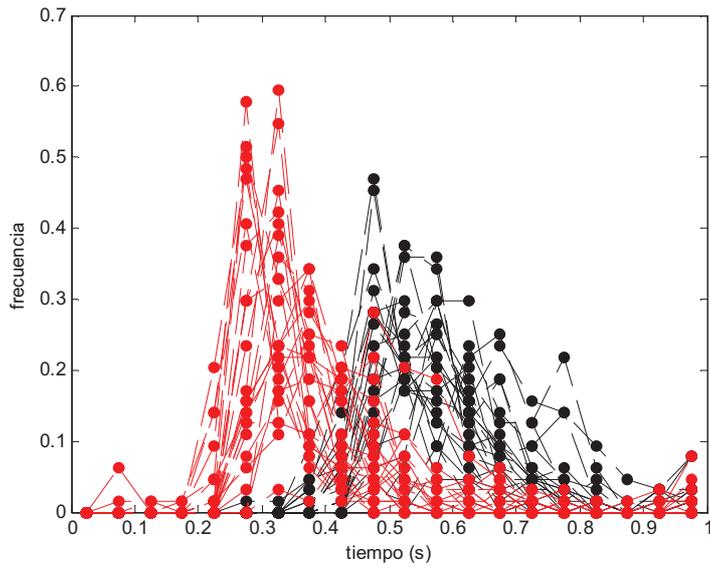


Figura 2. Gráficas obtenidas de 25 participantes. En rojo se muestran los tiempos de reacción simple y en negro los tiempos de reacción con identificación visual.

En el histograma se puede observar que además de existir un corrimiento en el tiempo, las curvas de tiempo de identificación visual se muestran más dispersas y menos simétricas que las del tiempo de reacción simple.

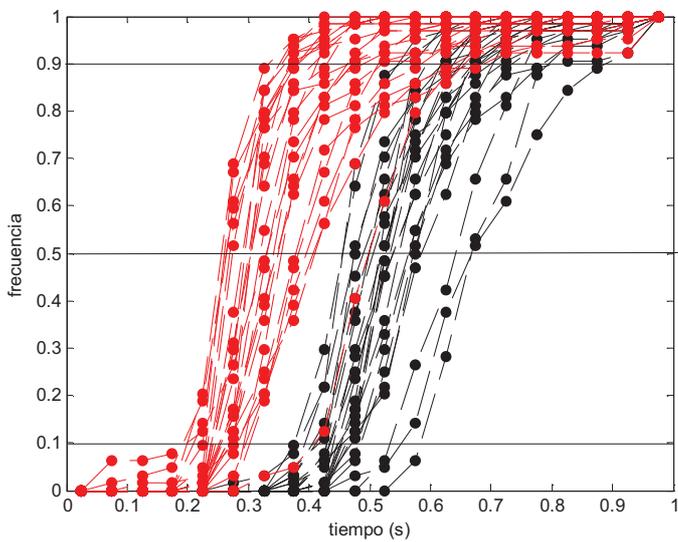


Figura 3. La gráfica muestra qué proporción de la población obtuvo los tiempos correspondientes a la prueba de detección (rojo) y de identificación visual (negro).

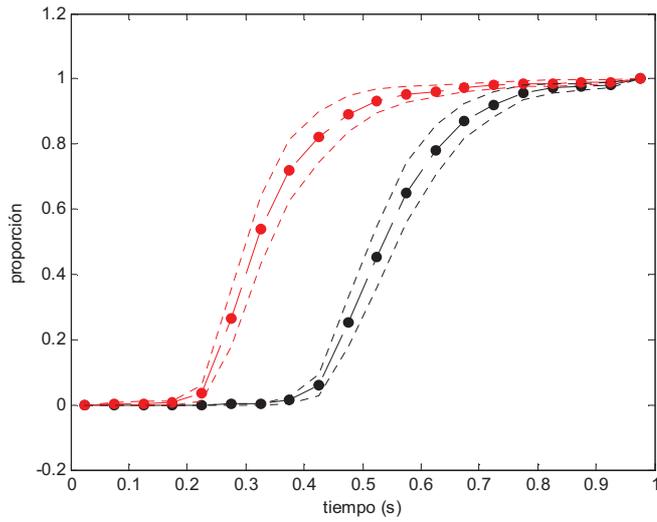


Figura 4. Promedio de los tiempos obtenidos por 25 participantes en la prueba de detección (rojo) y de identificación visual (negro), con un límite de confianza de 95%.

Se realizaron los histogramas correspondientes a la prueba de detección y de identificación visual para los percentiles 10,50 y 90.

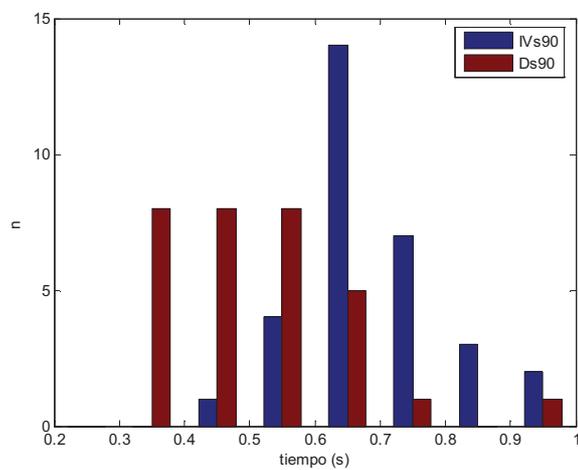
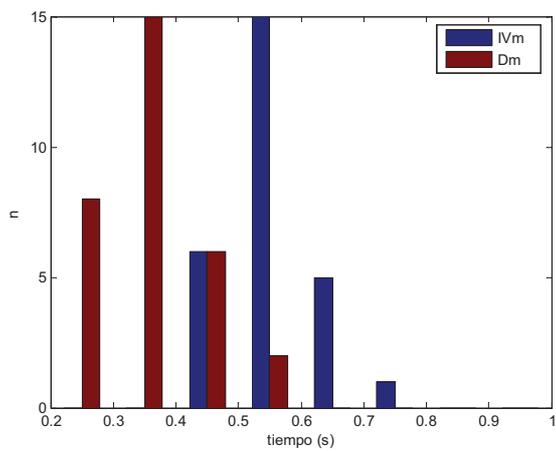
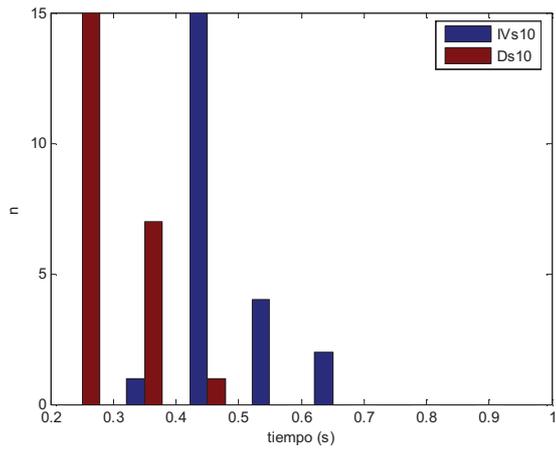


Figura 5. Histogramas de los tiempos obtenidos en las pruebas de detección (rojo) y de identificación visual (azul) para los percentiles 10,50 y 90.

Se graficó en la figura 6 el tiempo de identificación visual (IVm-Dm) en función del percentil correspondiente, observándose que los menores tiempos obtenidos son del orden de los 130 ms y los mayores son del orden de 260 ms..

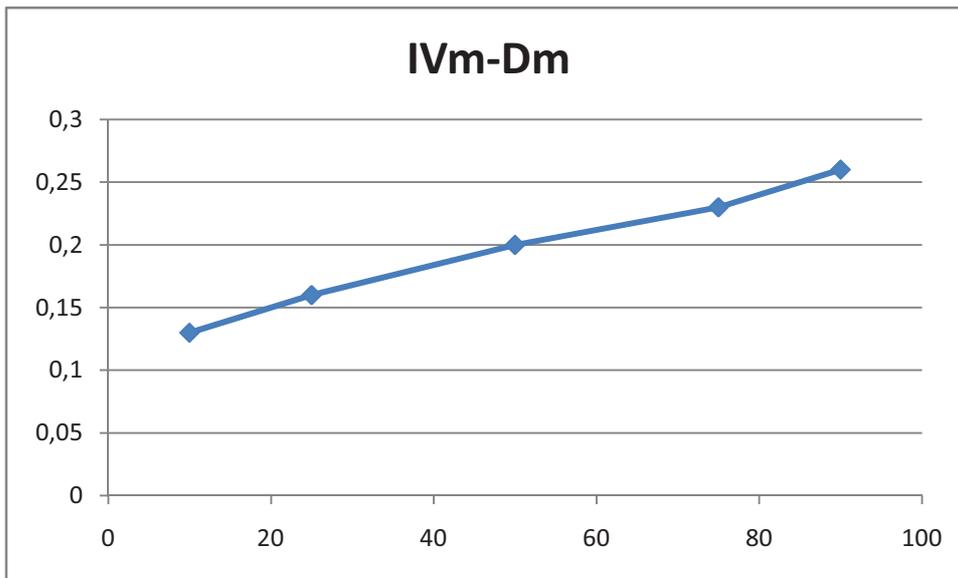


Figura 6. Tiempo de reconocimiento en función del percentil correspondiente

Se realizó el test de Wilcoxon para muestras apareadas (ranksum) para comparar los valores de tiempo obtenidos en las pruebas de identificación visual y de detección para cada participante. La probabilidad mayor de obtener el resultado al azar fue de $1,4930 \exp(-6)$, indicando la gran diferencia existente entre los valores obtenidos. Se compararon también las medianas correspondientes a las pruebas de identificación visual y de detección a través del mismo test, encontrándose una probabilidad de $9,0403 \exp(-11)$. Estos resultados demuestran la existencia de un tiempo de identificación visual, que difiere del tiempo de reacción simple.

Al discriminar los datos según el sexo se obtuvo un promedio de las medianas de los tiempos de reacción en la prueba de detección no discriminante de 376 ms para las mujeres y de 324 ms para los hombres. En la prueba de identificación visual los promedios fueron de 579 ms para las mujeres y 530 ms para los hombres. El tiempo implicado en la identificación fue de 202 ms y 207s respectivamente.

Se estudió la posible correlación entre la edad de los participantes y la velocidad de reacción para la toma de decisión a través del test de correlación de Pearson. No se encontró correlación alguna entre la edad y las demás variables (edad vs. NDm, $r=0,17$; edad vs. tiempo de identificación, $r=-0,13$; edad vs. Dm, $r=0,06$; edad vs. % de ND, $r=0,19$).

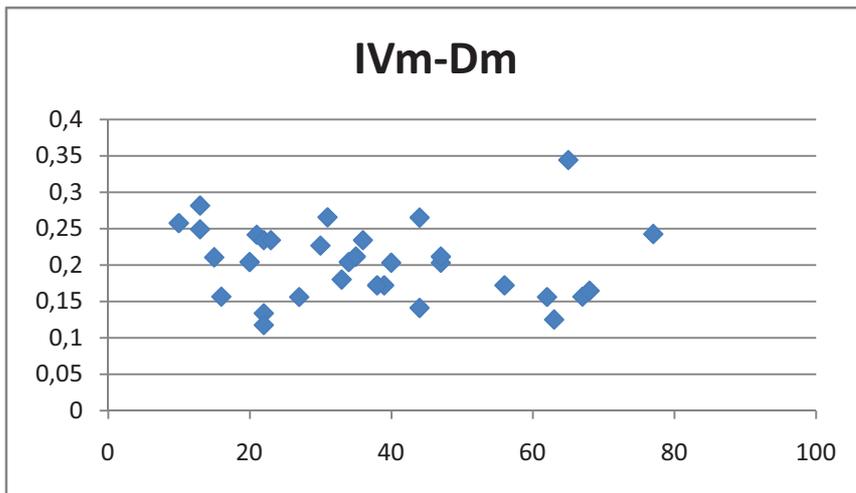


Figura 7. Tiempo de reconocimiento (IVm-Dm) en función de la edad de los participantes

Se restaron los tiempos correspondientes a la prueba de detección a los correspondientes a la prueba de identificación visual percentil a percentil para cada participante. Se halló la dispersión de la mediana y de los extremos de las distribuciones de dichas diferencias.

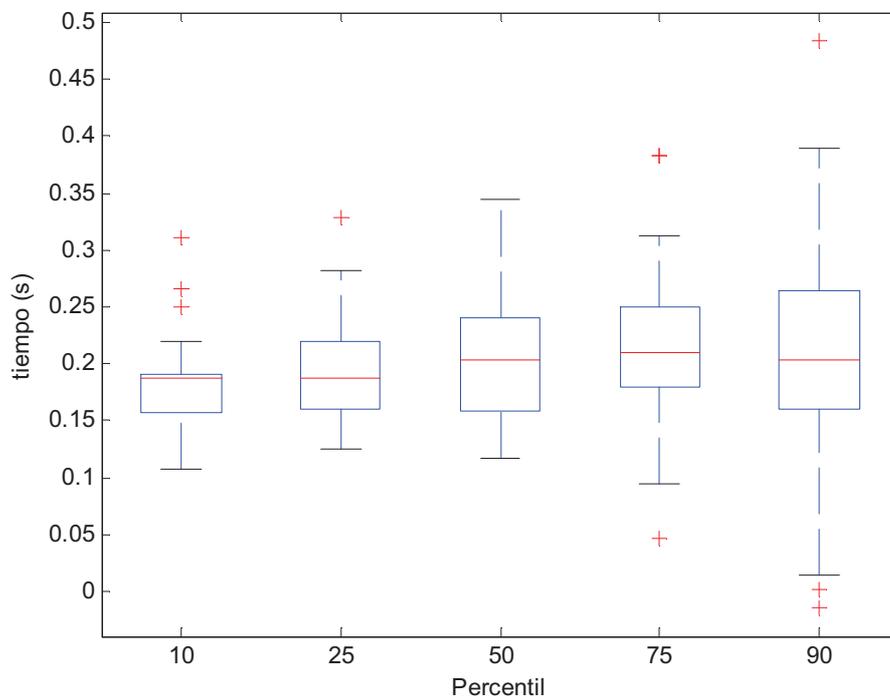


Figura 8. Dispersión de la mediana y de los extremos de las distribuciones de las diferencias IVs-Ds para cada percentil.

Experimento de control: efecto del patrón visual sobre la detección de cambio

El objetivo del presente experimento es verificar que el tiempo de detección de una imagen es equivalente al tiempo de reacción simple y no se modifica con el contenido semántico.

METODOS

Participantes

Participaron un total de 7 personas (6 de sexo femenino) con edades comprendidas entre los 23 y los 67 años de edad (44,3 en promedio). Todas tenían visión normal o corregida y manifestaron no sufrir enfermedades neurológicas y no estar ingiriendo medicación. Los participantes realizaron la prueba una única vez. Todos los participantes fueron informados sobre los objetivos del experimento y dieron su consentimiento para participar.

Estímulos y Procedimiento

Se elaboró un programa en Matlab 7.0 a través del cual se presentaron en forma aleatoria las 5 imágenes de distintos perros y otras 5 imágenes (teléfono, gato, elefante, flor, silla) intercaladas con imágenes que resultan de la mezcla aleatoria de todas las imágenes (Imagen "ruido"). Se les solicitó a los participantes que hicieran clic con el botón izquierdo lo más rápidamente posible al percibir que la imagen cambiaba.

Análisis de datos

Se obtuvieron los tiempos de reacción para la detección de imágenes y para la detección de imágenes "ruido."

RESULTADOS

Al incluir imágenes modificadas a la tarea de hacer clic al percibir que la imagen cambia se pudo observar cómo una imagen natural se percibe igual que una imagen con un cambio de patrón. Se graficaron los tiempos obtenidos al detectar las imágenes naturales y al percibir las imágenes alteradas.

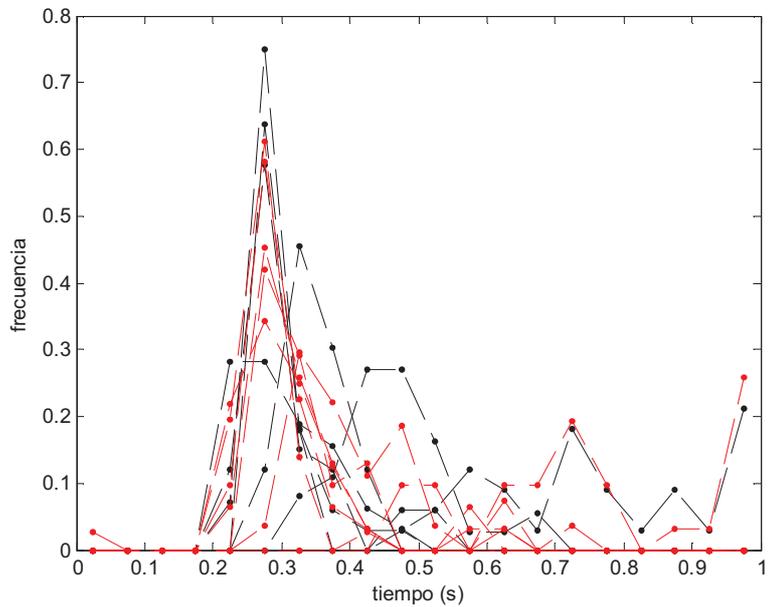


Figura 9. Gráficas obtenidas de 7 participantes. En rojo se muestran los tiempos obtenidos frente a la presentación de imágenes naturales y en negro los obtenidos al presentarse imágenes alteradas.

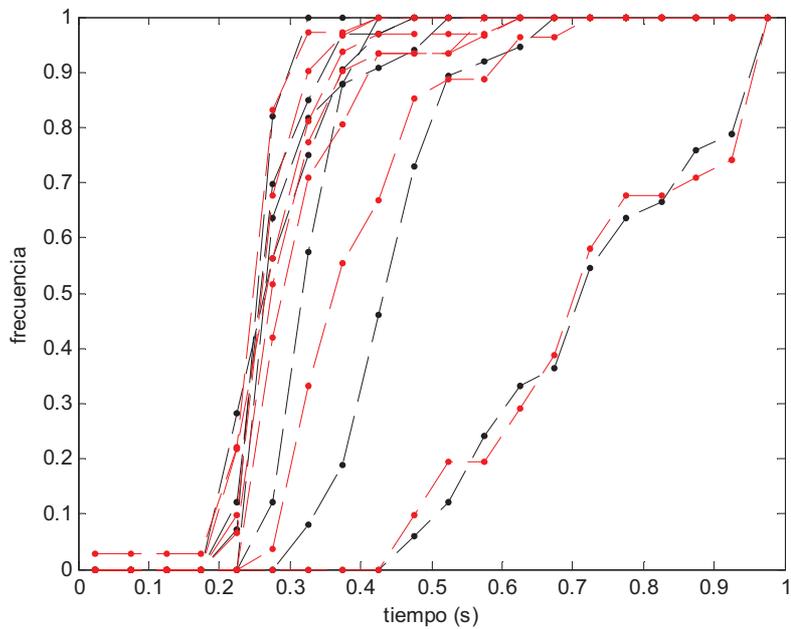


Figura 10. La gráfica muestra en qué proporción se obtuvieron los tiempos correspondientes a la detección de imágenes naturales (rojo) y de imágenes alteradas (negro).

Se realizó el test de Wilcoxon para muestras apareadas para comparar los valores de tiempo obtenidos en las fases discriminante y no discriminante para cada participante, obteniéndose un valor mínimo de 1, lo que indica la gran similitud entre los valores obtenidos.

Experimento de control: efecto del contraste

El objetivo de este experimento es confirmar la ley de Pieron para el tiempo de reacción simple e investigar si el tiempo de identificación es sensible al contraste.

METODOS

Participantes

Participaron un total de 12 personas (9 de sexo femenino) con edades comprendidas entre los 23 y los 67 años de edad (40,6 en promedio). Todas tenían visión normal o corregida y manifestaron no sufrir enfermedades neurológicas y no estar ingiriendo medicación. Todos los participantes fueron informados sobre los objetivos del experimento y dieron su consentimiento para participar.

Estímulos y Procedimiento

Se elaboró un programa en Matlab 7.0 a través del cual se presentaron en forma aleatoria las 5 imágenes de distintos perros y 5 imágenes distractoras (teléfono, gato, elefante, flor, silla) del experimento anterior. Se redujo el nivel de contraste de dichas imágenes a 3%, 10% y 25% para distintos participantes. Los niveles de contraste elegidos se basaron en el trabajo de J.M. Macé *et al.* que indican los valores de 10% y 3% como de especial interés pues se corresponden con la sensibilidad al contraste máxima que se suele atribuir a las vías parvocelular y magnocelular respectivamente (Macé *et al.*, 2005).

El experimento fue realizado con participantes que no habían visto las imágenes previamente (Dos participantes realizaron el experimento con contraste 3% y luego con contraste 25%).

Análisis de datos

Se obtuvieron los tiempos de reacción para ambas fases según los distintos niveles de contraste. Se restaron dichos valores, percentil a percentil, hallándose el promedio y el desvío estándar de dicha diferencia.

RESULTADOS

El tiempo de identificación visual se mostró robusto frente a cambios en el contraste.

Se obtuvieron las gráficas correspondientes a los tiempos obtenidos en las fases discriminante y no discriminante según los distintos niveles de contraste para los participantes (figura 11).

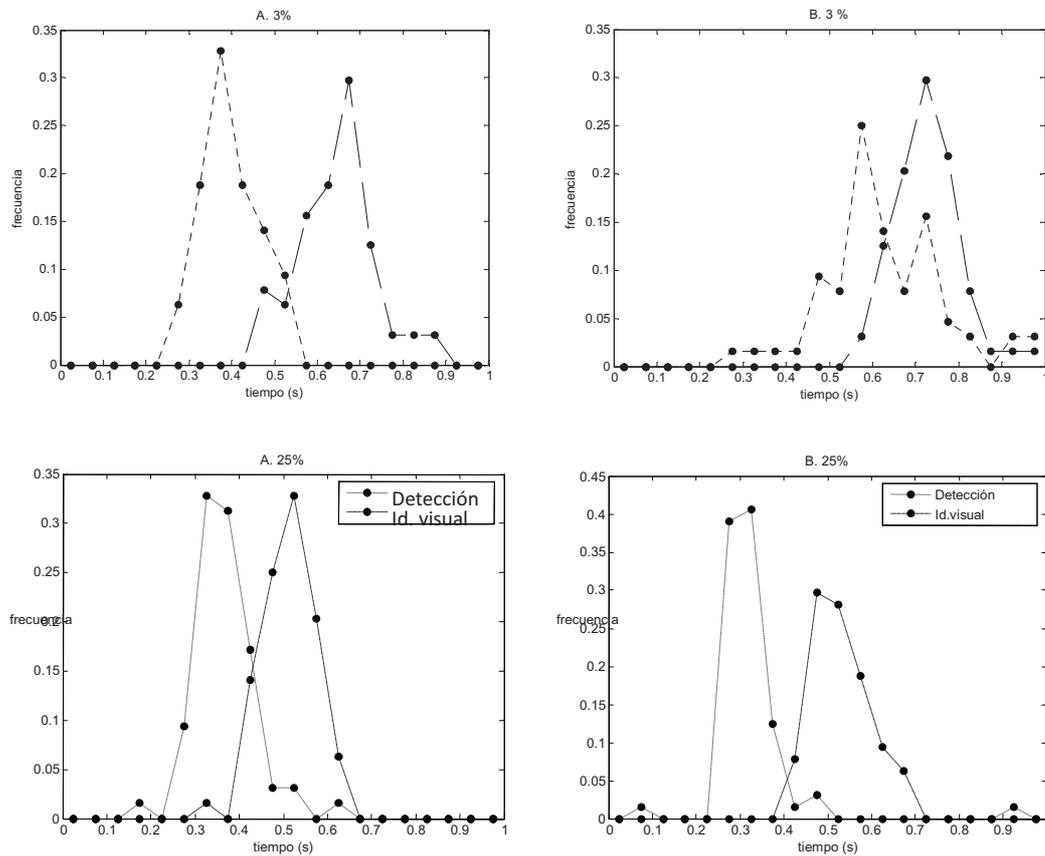


Figura 11. Gráficas de tiempo de identificación para las fases no discriminante y discriminante obtenidas para 2 participantes que realizaron la tarea con un contraste de 3% en primer lugar y luego con contraste de 25 %.

De las gráficas surge que si bien existe un corrimiento en los tiempos a contrastes bajos la diferencia de tiempo entre ambas fases no cambia significativamente.

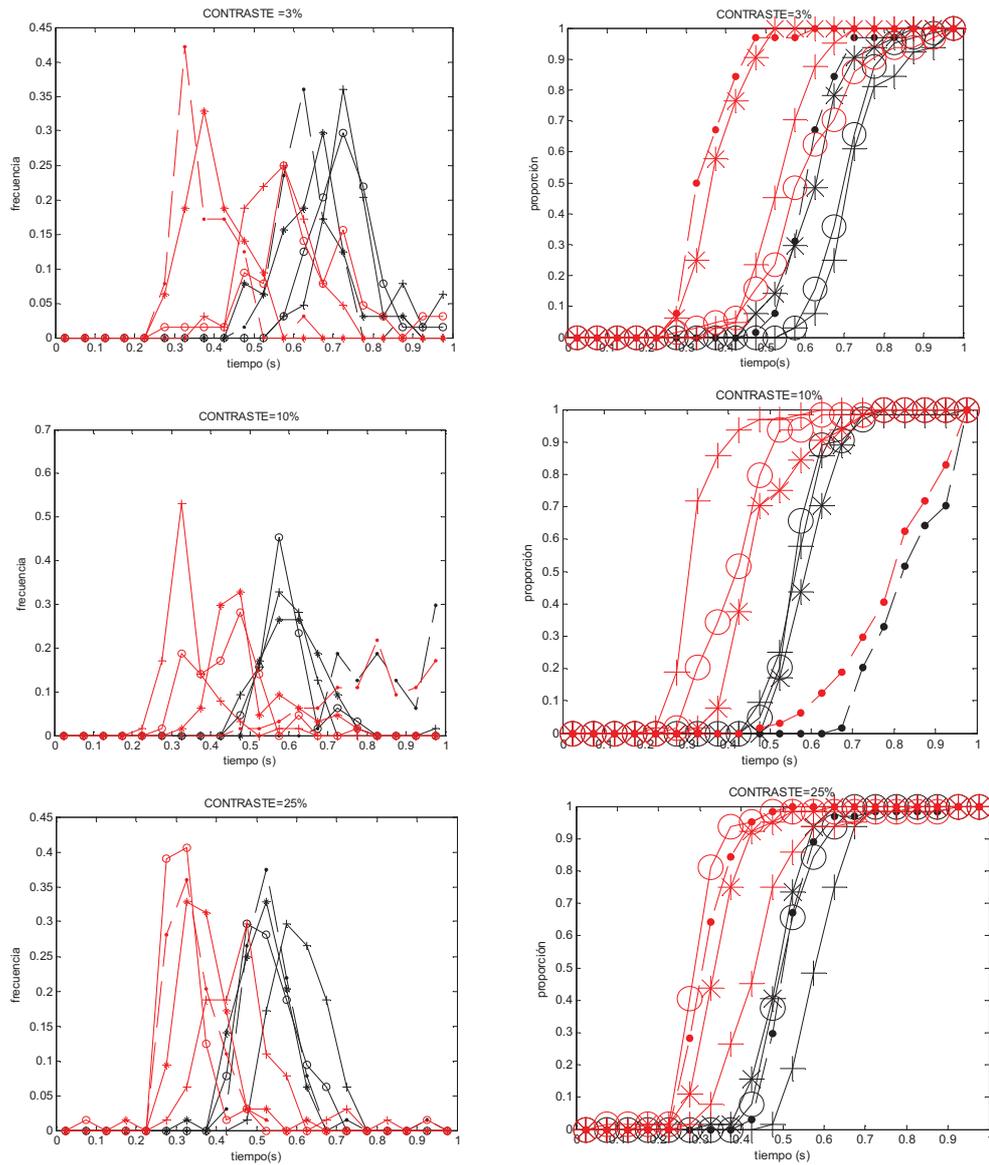


Figura 12. A la izquierda se muestran las gráficas obtenidas para todos los participantes de los tiempos de identificación para ambas fases (no discriminante, rojo; discriminante, negro) y a la derecha se muestra en qué proporción se observaron los distintos tiempos obtenidos. Los distintos símbolos corresponden a los distintos participantes.

Se graficaron en la figura 12 los tiempos obtenidos en las fases discriminante y no discriminante en función de los distintos niveles de contraste (3, 10, 25 y 100%). Se puede observar que las mayores diferencias se encuentran entre los niveles de contraste más bajos.

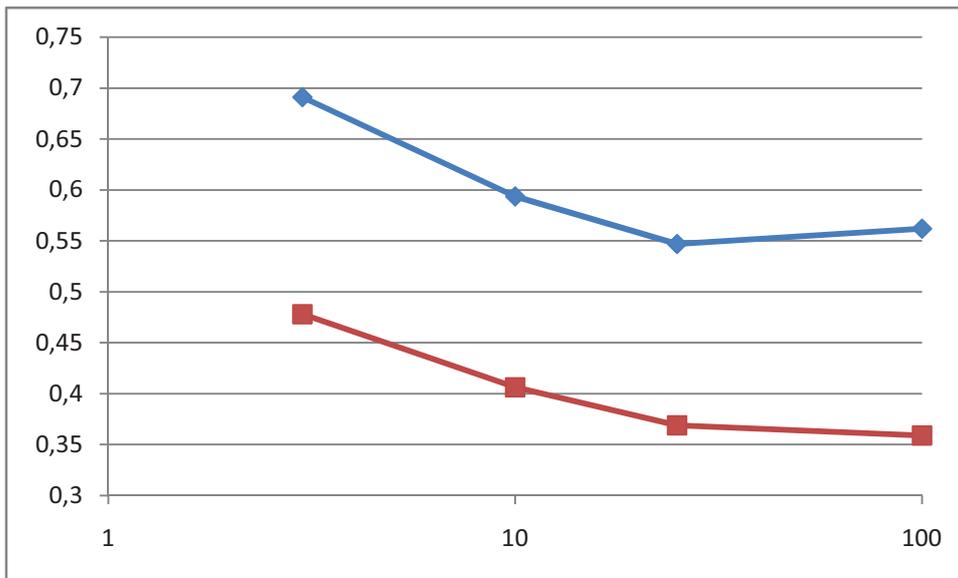


Figura 13. Tiempos obtenidos en las distintas condiciones experimentales en función del % de contraste (en escala logarítmica). En azul se muestra IVm promedio y en rojo Dm promedio.

En la figura 13 se puede observar que se ha obtenido la curva de Pieron. La intensidad de la imagen es equivalente al contraste si la intensidad media es constante. Esto es así pues así fueron diseñadas las imágenes.

Experimento 2: Identificación de imágenes naturales vs. identificación de imágenes simbólicas

Dado que mi interés a largo plazo es conocer mecanismos de procesamiento de lenguaje, tanto durante el desarrollo, el aprendizaje social, la patología y el envejecimiento, el siguiente paso fue adaptar la técnica para la evaluación de los tiempos de reacción durante el procesamiento del lenguaje y comparar dichos tiempos con los requeridos para la evaluación del significado de imágenes naturales. Los tiempos de reacción ya han sido utilizados en este sentido por Soler et al. (2002), quienes demuestran que la curva de Pieron puede ser obtenida cuando se sustituye la intensidad del estímulo por "frecuencia lexical" definida esta como la probabilidad de uso de una palabra en un grupo social cualquiera. En nuestro caso el primer objetivo fue comparar los tiempos de identificación de imágenes naturales con los tiempos de lectura de una palabra equivalente. Evitamos el efecto frecuencia lexical utilizando palabras e imágenes observadas con altísima frecuencia por la población Montevideana.

Para ello procedimos en dos etapas. En la primera mostramos que los tiempos de reacción obtenidos con una consigna inicial son similares a los tiempos obtenidos con una clave inmediatamente previa a la presentación de la imagen test. Este experimento demuestra que las diferencias de tiempos de reacción son despreciables cuando se varía la forma de utilización de la memoria de trabajo dentro de los márgenes establecidos en este estudio. Habiendo cumplido dicho objetivo se

compara en la segunda etapa la identificación del significado de imágenes naturales y palabras escritas, utilizando un protocolo similar.

METODOS

Participantes

Participaron un total de 16 personas (8 de sexo femenino) con edades comprendidas entre los 15 y los 77 años de edad (36,7 en promedio). Todas tenían visión normal o corregida y manifestaron no sufrir enfermedades neurológicas y no estar ingiriendo medicación. 2 personas eran zurdas. Todos los participantes fueron informados sobre los objetivos del experimento y dieron su consentimiento para participar.

Estímulos y Procedimiento

Se elaboró un programa en Matlab 7.0 a través del cual se presentaron palabras escritas en imprenta mayúscula, seguidas de una imagen al azar. Se usaron 5 palabras y 6 imágenes (elefante, gato, silla, perro, flor, teléfono). Se les solicitó a los participantes que hicieran clic con el botón izquierdo del mouse lo más rápidamente posible únicamente cuando la imagen coincidía con la palabra anteriormente presentada. En una segunda etapa se presentaron las mismas imágenes que en el Experimento 1 y los participantes debían hacer clic al ver un perro.

Análisis de datos

Se obtuvieron las medianas de los tiempos de reacción para ambas fases (de identificación visual y de discriminación de palabras). Se calculó la distancia intercuartil para ambas fases, comparándolas utilizando el test de Wilcoxon de rangos signados. Dado que a pesar de que los tiempos precoces (percentil 10) o la mediana (percentil 50) fueron similares en ambas condiciones experimentales, se observaron claras diferencias en la distribución de los tiempos de reacción, se analizaron en detalle las diferencias entre los histogramas. Para ello se desplegó en forma de raster la serie de respuestas para descartar que las diferencias se debiesen a aprendizaje durante la prueba y se estudio el diagrama de retorno para evaluar la probabilidad de la ocurrencia tiempos "de descanso" únicos o múltiples durante la prueba.

RESULTADOS

A fin de explorar cuánto se afecta el tiempo de reacción al comparar el precepto de la imagen de prueba con un concepto almacenado en memoria de trabajo diferente se obtuvieron datos sobre el tiempo de reacción con identificación visual de palabras, presentándoles a los participantes una palabra seguida de una imagen. La tarea consistió en hacer clic con el mouse únicamente cuando coincide la palabra presentada con la imagen presentada posteriormente. Luego se les presentaron a los participantes una serie de imágenes, solicitándoles que hicieran clic con el mouse únicamente al ver un perro.

Se aplicó el test de Wilcoxon (signrank) para estudiar los valores de tiempo de identificación de imágenes naturales y de símbolos. Para el percentil 10 se obtuvo un

valor de 0,0011, para el percentil 50 de 0,7403 y para el percentil 90 de 2,9305 exp.-4. Se realizaron también histogramas para comparar las distribuciones de las medianas y los extremos en ambas pruebas (figura 14). Se puede observar que en el percentil 10 el “priming” semántico inmediato acorta el tiempo de reacción cuando la persona está descansada. Esto no se observa en el percentil 50 y en el percentil 90 la tendencia se invierte.

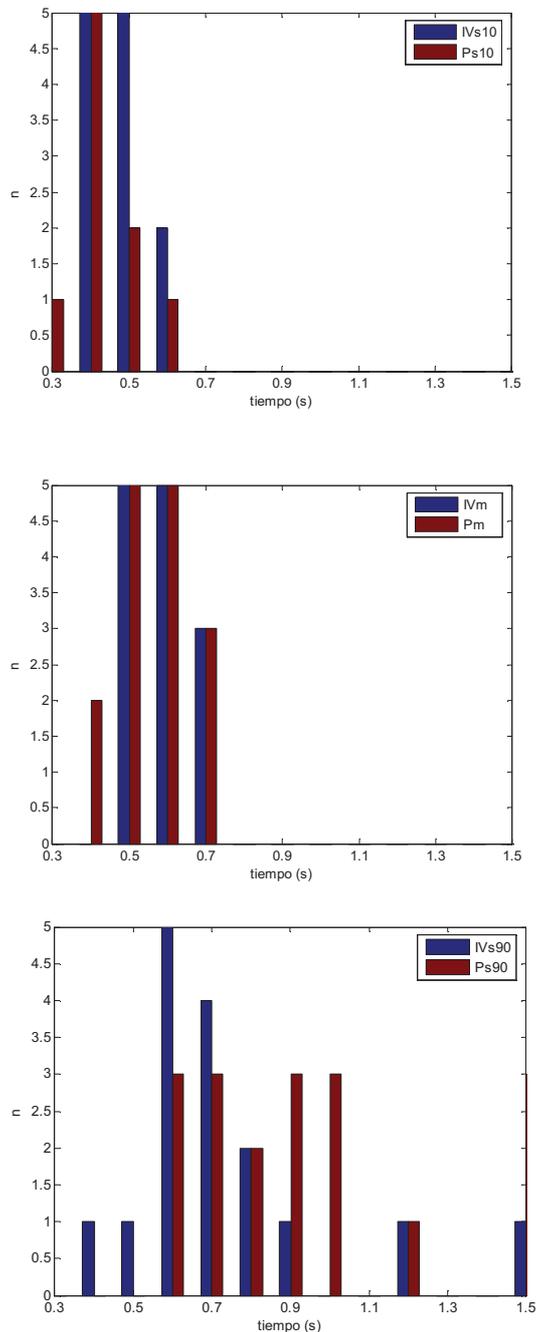


Figura 14. Histogramas de los tiempos obtenidos en la fase de identificación visual (azul) y de discriminación de palabras (rojo) para los percentiles 10, 50 y 90.

El promedio de las medianas de los tiempos de reacción en la prueba de identificación visual de discriminación de palabras fue de 552 ms y el de la prueba de identificación visual de discriminación de imágenes fue de 553 s. Cuando se compararon las medianas de dichos tiempos se puede apreciar que en 7 casos los tiempos de identificación de palabras son mayores que los de identificación de imágenes naturales, lo que no muestra una tendencia clara.

Se realizó el test de correlación de rangos de Spearman entre las medianas del tiempo de procesamiento en la tarea de discriminación de palabras y la edad de los participantes, obteniéndose una rho de 0,259 (P valor mayor a 0,1), lo cuál no indica la existencia de correlación entre dichos datos.

Se estudió la distancia intercuartil para las fases de discriminación de imágenes (Ds 75-Ds25) y de palabras (Ps 75-Ps25). Se vio así una mayor dispersión en la prueba de identificación visual de discriminación de palabras (0,2561s en promedio) que en la de imágenes (0,1432 s en promedio). Se realizó el test de rangos signados de Wilcoxon para comparar ambas distancias intercuartiles, obteniéndose un valor de 0,0065, lo que indica una gran diferencia entre ambas condiciones.

Se restaron también los tiempos correspondientes a los distintos percentiles para la identificación de palabras e imágenes (Ppercentil-Dspercentil) y se realizó la gráfica de la dispersión de la mediana y de los extremos de las distribuciones de las diferencias Ps-Ds para cada percentil. En la figura 15 se puede observar que la resta entre las medianas es cercana a 0.

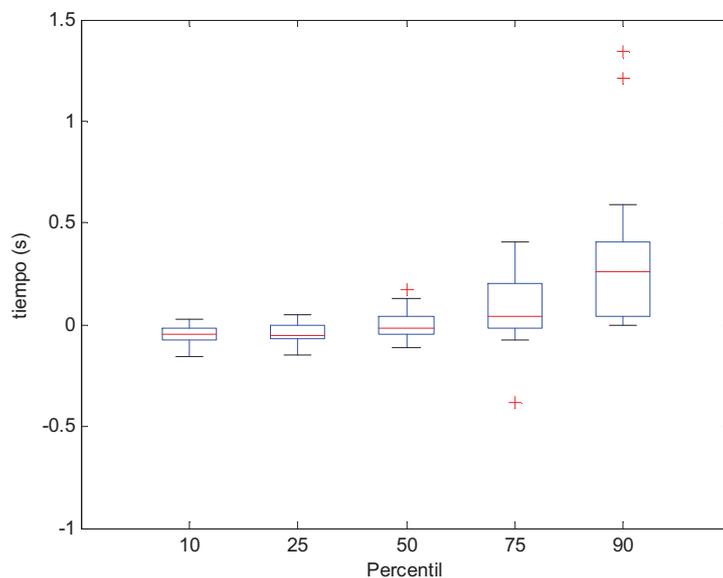


Figura 15. Dispersión de la mediana y de los extremos de las distribuciones de las diferencias entre el tiempo de procesamiento de palabras y el tiempo de procesamiento de imágenes para cada percentil.

Del gráfico surge que pasado el percentil 50 existe mayor dispersión en el reconocimiento de palabras respecto al de imágenes.

Se obtuvieron gráficas de tiempo de discriminación de palabras e imágenes para cada participante. Al analizarlas se encontraron dos patrones diferentes: un tipo de gráfica con 4 o más picos y otro tipo de gráfica con 3 o menos picos. Dadas las diferencias obtenidas en la forma del histograma se plantearon tres hipótesis para explicarlas: a) el aprendizaje a lo largo de la prueba, b) fatiga y c) que la mayor dispersión fuese debida a la utilización de más de un concepto en la prueba con “priming” inmediato antes de la imagen natural de prueba. De estas tres posibilidades se descartan la primera y la última por las siguientes razones:

Algunos participantes realizaron el experimento nuevamente, obteniéndose el mismo patrón.

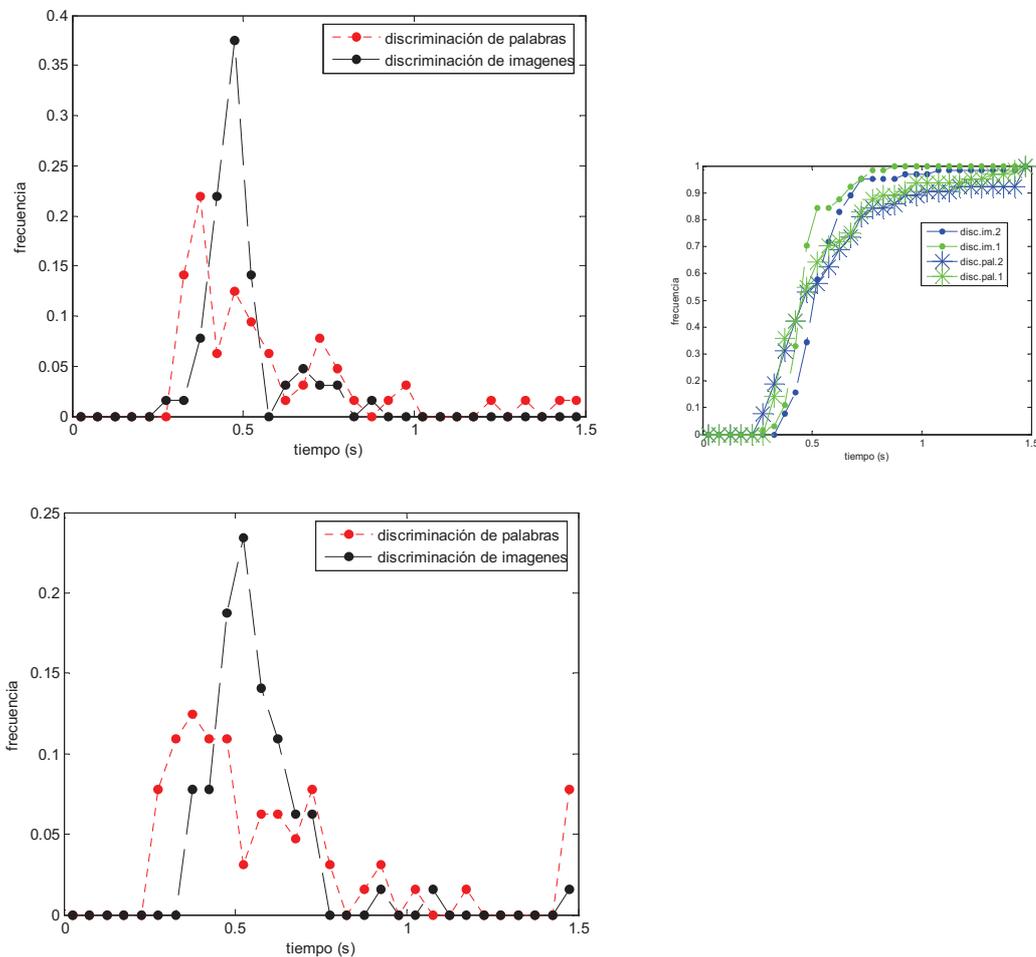


Figura 16. Gráficas obtenidas de una misma persona que realizó la prueba por segunda vez (inferior) y comparación de en qué proporción se obtuvieron los distintos tiempos en ambas pruebas (derecha). Las pruebas fueron realizadas distintos días.

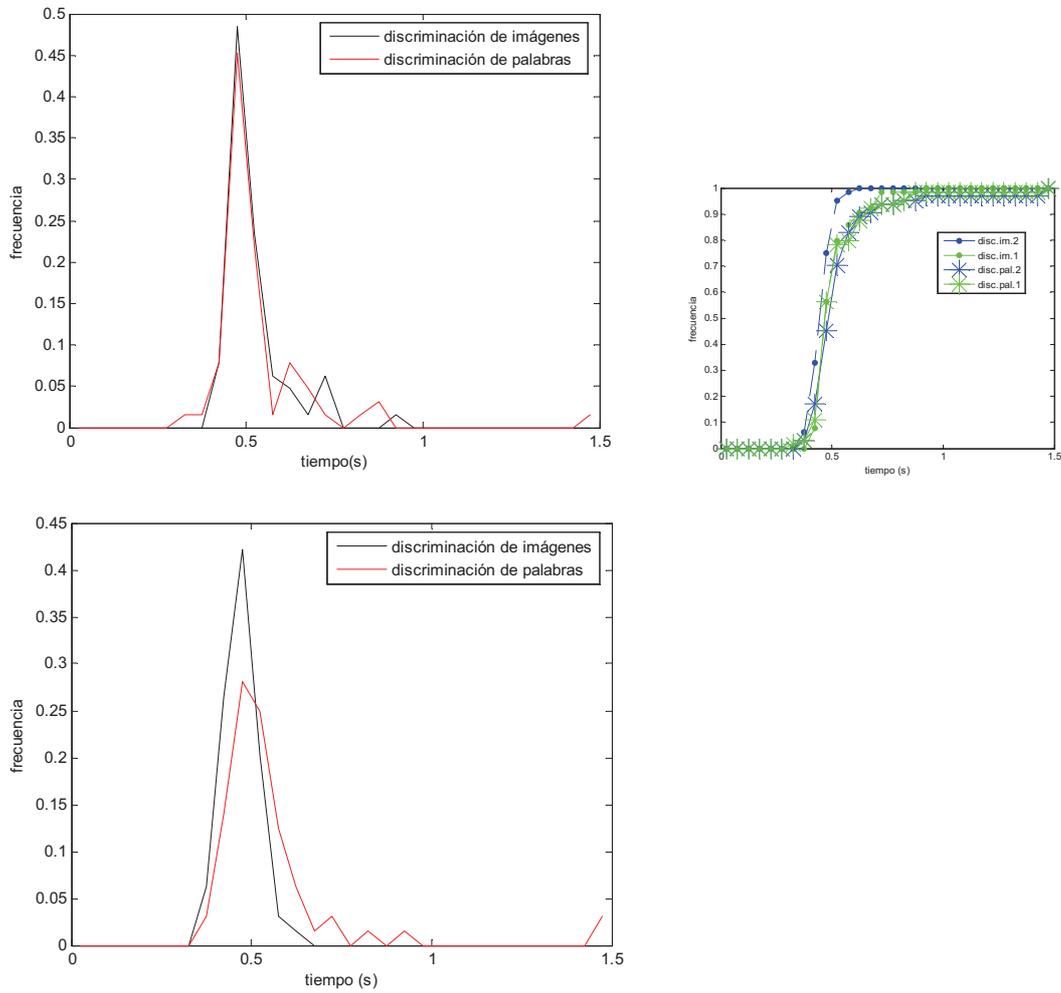


Figura 17. Gráficas obtenidas de una misma persona, con un patrón de menos picos que la anterior, que realizó la prueba por segunda vez (inferior) y comparación de en qué proporción se obtuvieron los distintos tiempos en ambas pruebas (der). Las pruebas fueron realizadas distintos días.

Se graficó el tiempo de identificación en función de las imágenes presentadas buscando la posible presencia de una disminución en el tiempo al avanzar el experimento debido a un aprendizaje.

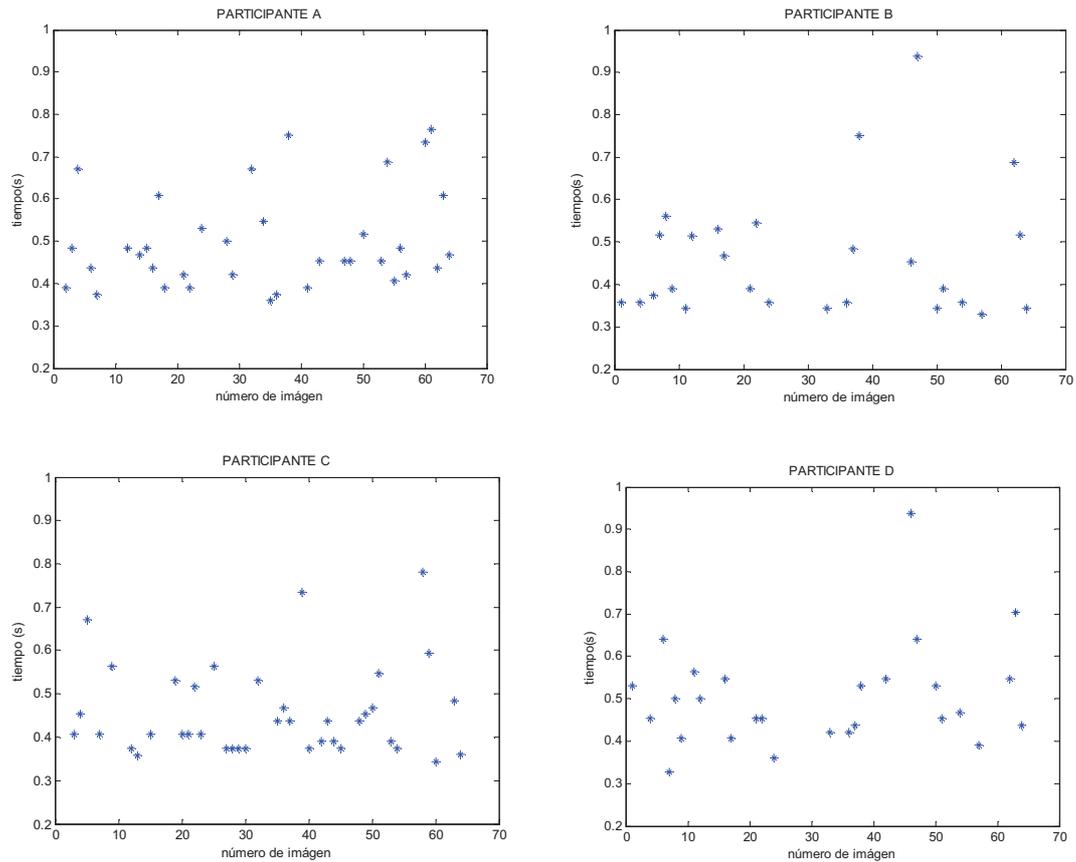


Figura 17. Gráficas de tiempo de identificación palabra-imagen gato correspondientes a distintos participantes para estudiar la posible presencia de aprendizaje.

La hipótesis del aprendizaje intra experimento se descarta por a) la equiprobabilidad en distintos trozos de los rasters y b) la repetición de experimentos en las mismas personas, lo que muestra que el histograma tiene un perfil dependiente del individuo y no varía con la prueba.

Con respecto a la hipótesis del número de conceptos y diferencias entre los mismos se reprocesaron los datos obtenidos con el fin de identificar los tiempos correspondientes a las distintas imágenes. Se encontró allí que se había cometido un error en el programa por el cual la frecuencia de aparición de imágenes del gato había sido mayor y no existía coincidencia entre palabra e imagen para el elefante y la flor. Se obtuvieron por lo tanto las medianas de los tiempos de identificación para el gato, el perro, el teléfono y la silla para cada participante. Se observó que los tiempos menores se encontraban en su mayoría en la identificación del gato. Se pensó entonces en la existencia de aprendizaje, por ser el gato de más frecuente aparición.

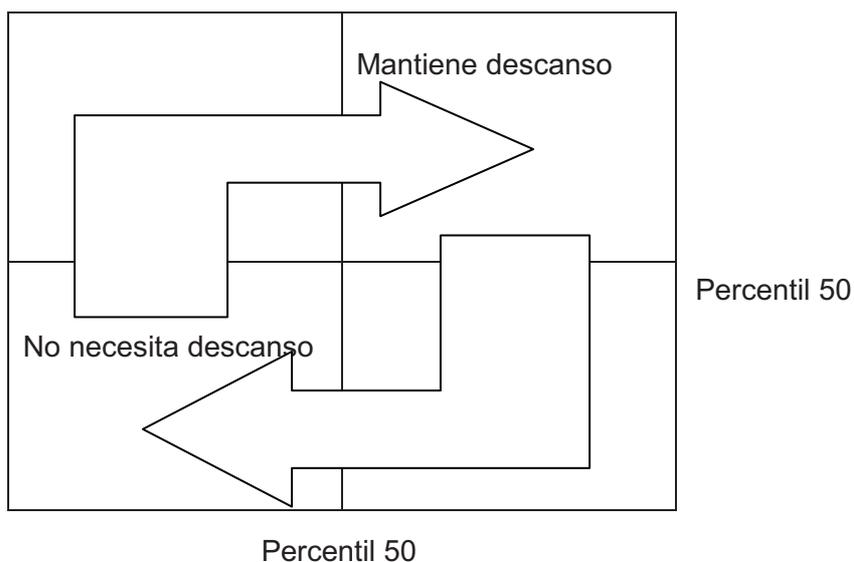
Al reprocesar los datos obtenidos se realizó el test de Wilcoxon (ranksum) para comparar las medianas de los tiempos obtenidos en la identificación de cada imagen. Se buscó analizar si existían diferencias significativas entre los tiempos de identificación de objetos creados por el ser humano y los tiempos de identificación de animales. Se encontró que los tiempos de identificación de los distintos objetos no tuvieron diferencias significativas.

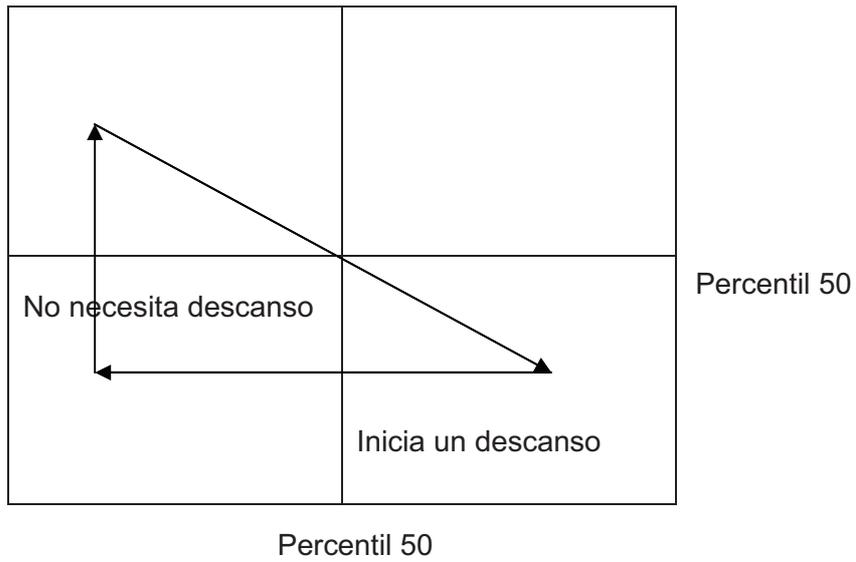
	gato	teléfono	silla	perro
gato		0.1027	0.2411	0.0625
teléfono			0.8903	0.9817
silla				0.8722
perro				

Tabla 1. Resultados obtenidos al aplicar el test de Wilcoxon (ranksum) entre las medianas de los tiempos de identificación de cada imagen.

Con respecto a la hipótesis de la fatiga, se graficó el tiempo de identificación en función del tiempo de identificación obtenido en el intento anterior para cuatro participantes.

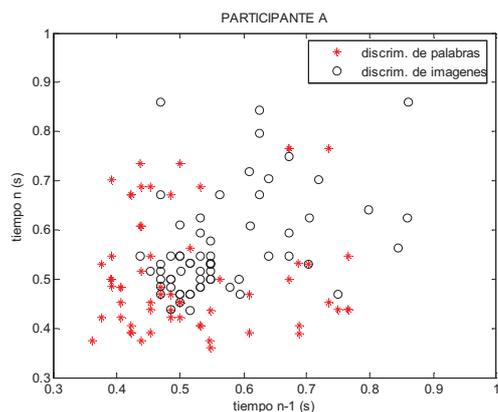
A los efectos de analizar los resultados obtenidos se plantean los siguientes esquemas:





En el primer caso la persona inicia un descanso, lo mantiene y luego vuelve a la tarea.

En el segundo caso se inicia un descanso y se vuelve a la tarea tras un único evento de descanso.



En la tarea - 49% de los casos

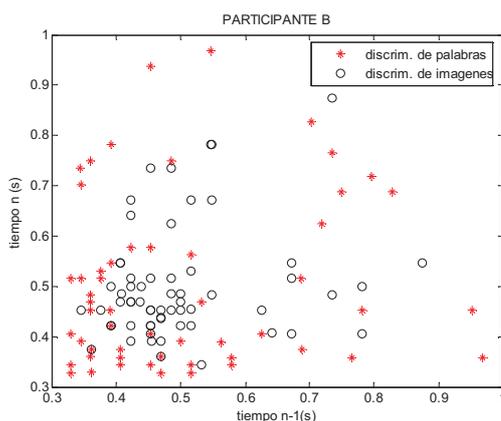
Inicia un descanso-30% de los casos

Mantiene un descanso-21% de los casos

En la tarea - 68% de los casos

Inicia un descanso-24% de los casos

Mantiene un descanso-8% de los casos



En la tarea - 49% de los casos

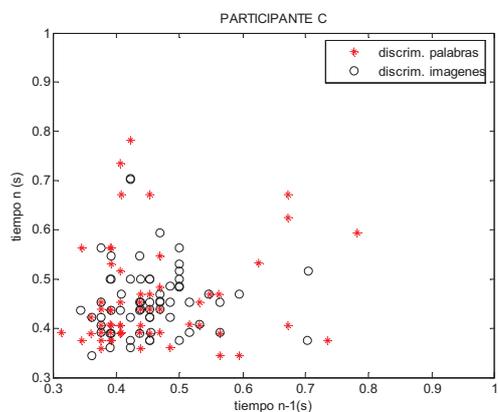
Inicia un descanso-22% de los casos

Mantiene un descanso-29% de los casos

En la tarea - 51% de los casos

Inicia un descanso-17% de los casos

Mantiene un descanso-32% de los casos



En la tarea - 49% de los casos

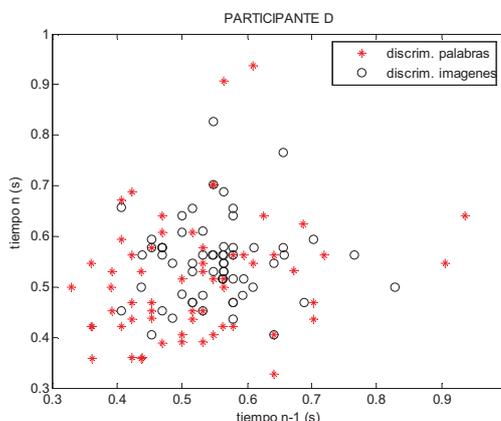
Inicia un descanso-21% de los casos

Mantiene un descanso-30% de los casos

En la tarea - 67% de los casos

Inicia un descanso-17% de los casos

Mantiene un descanso-16% de los casos



En la tarea - 51% de los casos

Inicia un descanso-19% de los casos

Mantiene un descanso-30% de los casos

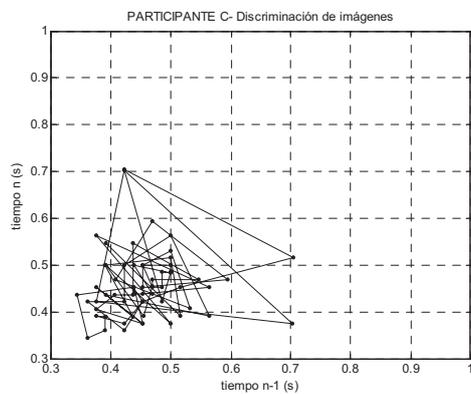
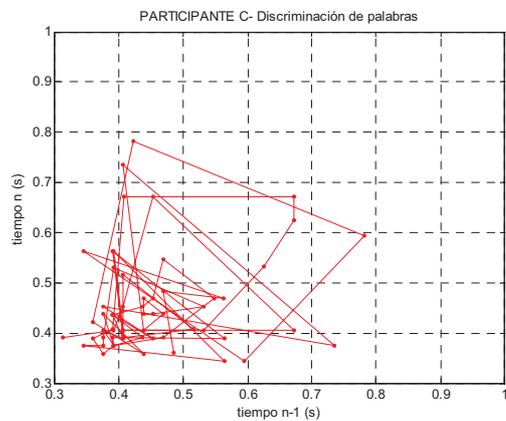
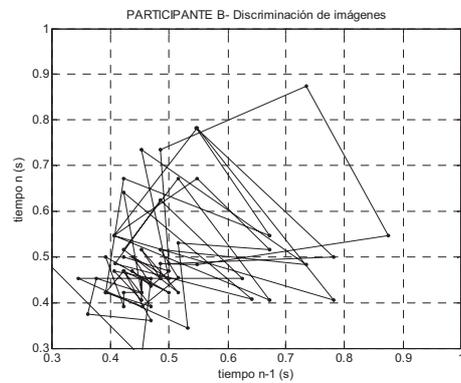
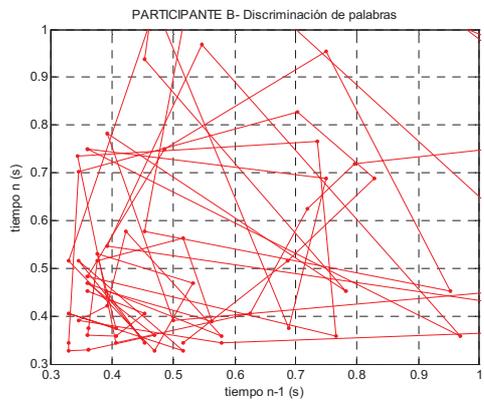
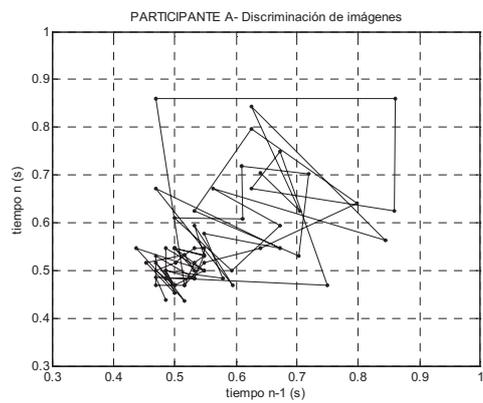
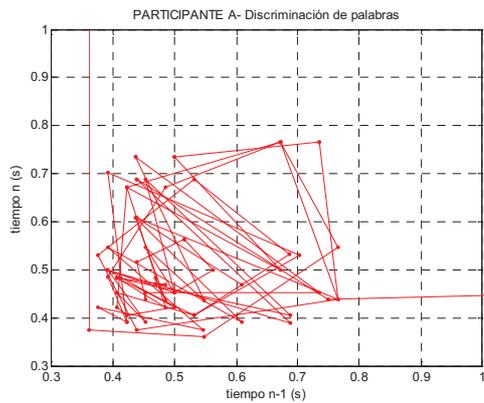
En la tarea - 65% de los casos

Inicia un descanso-17,5% de los casos

Mantiene un descanso-17,5% de los casos

Figura 18. Gráficas de tiempo de identificación en función del tiempo de identificación obtenido en el intento anterior y performance en las tareas de identificación de palabras (rojo) y de imágenes (negro).

Se puede ver que existe un cansancio atencional al realizar ambas pruebas y que salvo para el participante C, que por su trabajo se encuentra entrenado para trabajar frente a una computadora, se observa un corrimiento en los tiempos al realizar la tarea de identificación de imágenes. Se desprende que los distintos participantes muestran distintos patrones para enfrentar la tarea: algunos tienden a necesitar de más eventos de descanso más regularmente que otros. Se obtuvieron los distintos patrones de trabajo de esos cuatro participantes, al realizar ambas tareas. Se pudo ver que, a pesar de que los tiempos en la tarea de discriminación de imágenes se encuentran desplazados hacia la derecha, la tarea de discriminación de palabras requiere de más eventos de descanso “largos” o mantenidos.



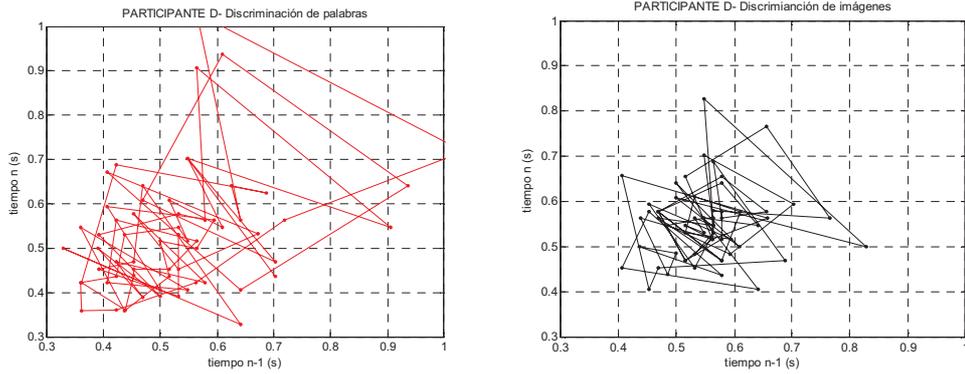


Figura 19. Distintos patrones de trabajo y descanso mostrados por los cuatro participantes de la figura anterior.

Se realizó un experimento de control en el que se invirtió el orden de las tareas. Se les solicitó a los participantes que hicieran clic con el mouse al ver la imagen de un perro en primer lugar y en una segunda etapa que hicieran clic únicamente cuando la imagen coincide con la palabra presentada anteriormente. El objetivo de dicho experimento fue analizar el posible rol del cansancio y del “priming” semántico en los resultados obtenidos.

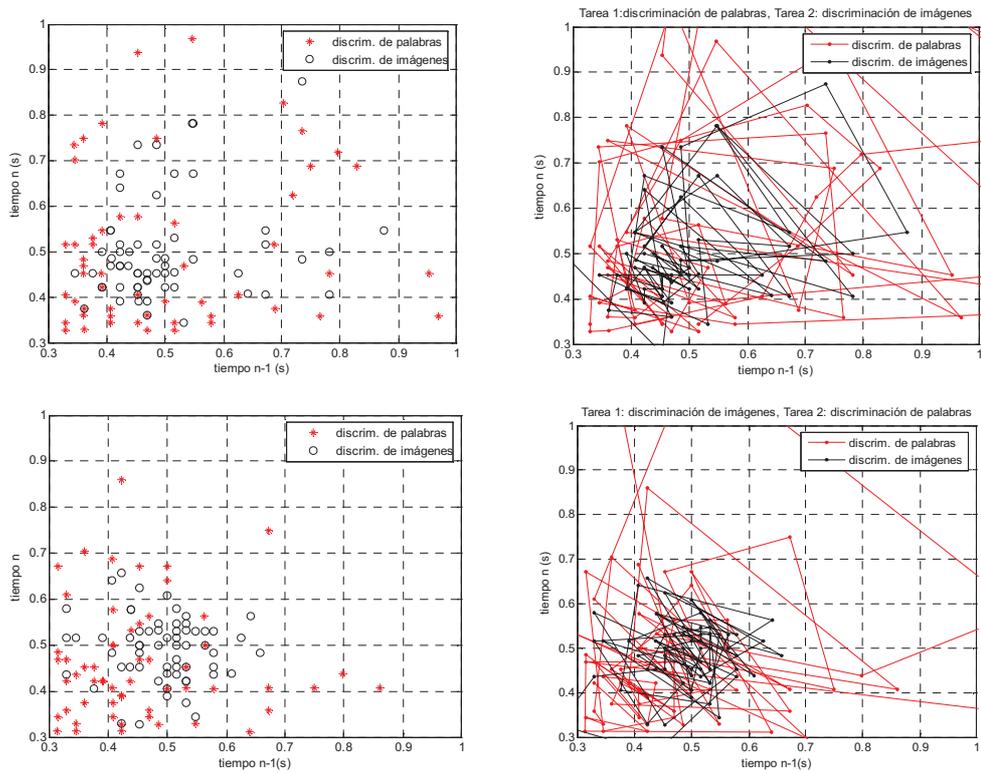


Figura 20. Gráficas de tiempo de identificación en función del tiempo de identificación obtenido en el intento anterior para un mismo participante que realizó el experimento en primer lugar en el orden habitual (superior) y otro día con el orden de las tareas invertido (inferior).

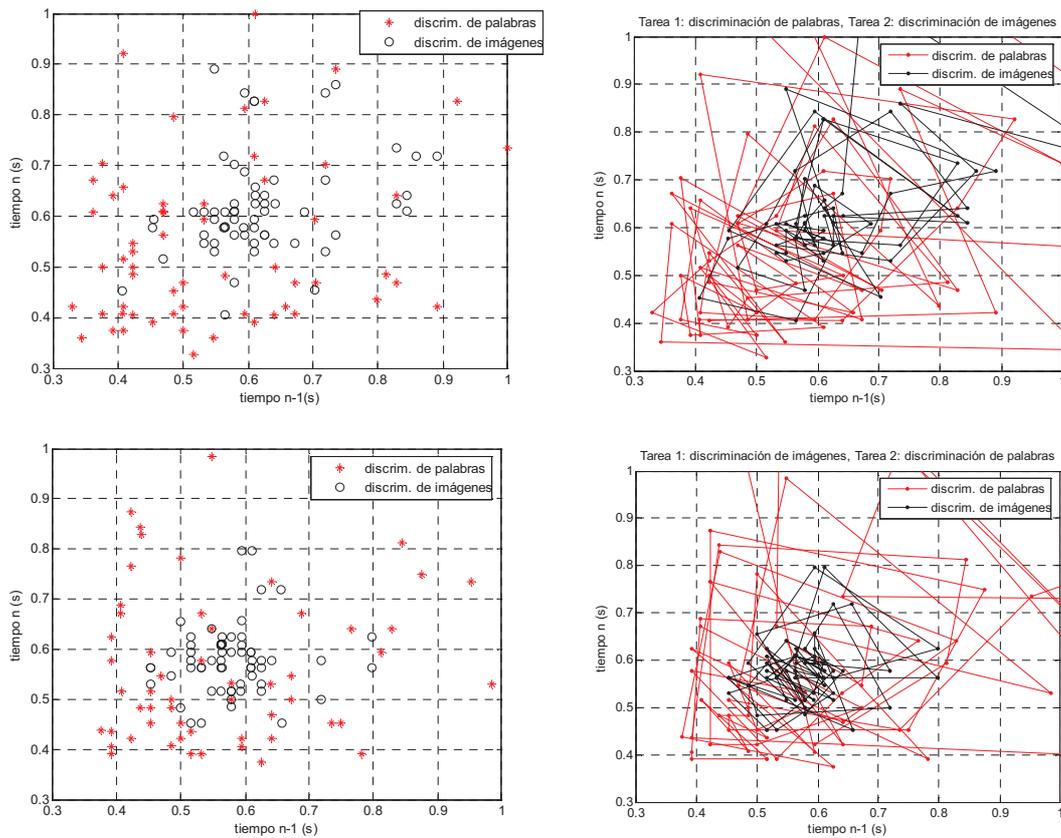


Figura 21. Gráficas de tiempo de identificación en función del tiempo de identificación obtenido en el intento anterior para un mismo participante que realizó el experimento en primer lugar en el orden habitual (superior) y otro día con el orden de las tareas invertido (inferior).

Para estas dos personas no se observan diferencias significativas al invertir el orden de las tareas, lo que coincide con los resultados planteados en la bibliografía acerca de que los tiempos de reacción son menores cuando la palabra a clasificar o nombrar es precedida por un contexto relacionado (Holcomb, 19993). Por otra parte, se podría pensar al ver el cuadro superior a la derecha en ambas figuras, que se necesitan más eventos de descanso mantenido para la tarea de discriminación de imágenes cuando ésta es realizada en segundo lugar.

Comparación de la identificación del significado de imágenes naturales y palabras escritas

A partir de los resultados obtenidos en el experimento anterior nos planteamos la siguiente pregunta: ¿lleva más tiempo reconocer una imagen o una palabra? En base a la influencia del “priming” que pudimos observar en el pasado experimento decidimos utilizar un “priming” inmediato en las dos tareas a plantear en este experimento. En una tarea el “priming” se trata de una palabra escrita y en la otra se trata de una imagen natural. Dado que este es un experimento preliminar, de carácter exploratorio, que no pretende abarcar totalmente el problema, no se realizaron los controles en los que una palabra es antecedita por una palabra o una imagen es antecedita por una imagen.

METODOS

Participantes

Participaron un total de 10 personas (7 de sexo femenino) con edades comprendidas entre los 23 y los 91 años de edad (47,4 en promedio). Todas tenían visión normal o corregida y manifestaron no sufrir enfermedades neurológicas y no estar ingiriendo medicación. Todos los participantes fueron informados sobre los objetivos del experimento y dieron su consentimiento para participar.

Estímulos y Procedimiento

Se elaboró un programa en Matlab 7.0 a través del cual se presentaron palabras escritas en imprenta mayúscula, seguidas de una imagen al azar. Se usaron 6 palabras y 6 imágenes (elefante, gato, silla, perro, flor, teléfono). Se les solicitó a los participantes que hicieran clic con el botón izquierdo del mouse lo más rápidamente posible únicamente cuando la imagen coincidía con la palabra anteriormente presentada.

En una segunda etapa se presentaron las imágenes seguidas de una de las 6 palabras mencionadas anteriormente, con la misma consigna que en la condición experimental anterior.

Se incluyó una pantalla gris para separar los pares palabra-imagen o imagen-palabra con el fin de evitar confusiones por parte de los participantes.

Se elaboró otro programa en el que se comienza por la segunda etapa (Imagen-Palabra) y se continúa con la condición Palabra-Imagen para evaluar la posibilidad de un aumento en el tiempo de reacción debido a cansancio.

Análisis de datos

Se obtuvieron las medianas de los tiempos de reacción para ambas fases. Se calculó la distancia intercuartil para ambas fases, comparándolas utilizando el test de Wilcoxon de rangos signados.

RESULTADOS

Se obtuvieron datos sobre el tiempo de discriminación ante la presentación de una palabra seguida de una imagen y de una imagen seguida de una palabra. La tarea consistió en hacer clic con el mouse únicamente cuando imagen y palabra coinciden.

Cuatro personas realizaron el experimento con la condición Palabra-Imagen en primer lugar y seis personas lo hicieron en el orden inverso. El promedio de las medianas de los tiempos de reacción en la prueba Palabra-Imagen fue de 549 ms para quienes realizaron esta tarea en primer lugar y de 603 ms para quienes lo hicieron en segundo lugar. El valor obtenido para la prueba Imagen-Palabra fue de 634 ms para quienes realizaron esta tarea en primer lugar y de 598 ms para quienes lo hicieron en segundo lugar. Es decir que en ambos grupos se observó un aumento de los tiempos de discriminación en la prueba Imagen-Palabra. Al restar los tiempos obtenidos cuando el "priming" es una imagen menos los obtenidos cuando el "priming" es una palabra se obtienen valores positivos en ambas condiciones del experimento. Para P50 encontramos una diferencia de 31 ms (634ms-603ms) cuando la condición en que la imagen es el "priming" se da en primer lugar y de 49 ms (598ms -549ms) cuando la condición en que la imagen es es el "priming" se da en segundo lugar. Al comparar estas diferencias caso a caso se observa que se obtienen resultados negativos en 3 de 10 de casos. Cuando se analizaron esas mismas diferencias para el percentil 10, se hallaron valores de 36 ms cuando la condición en que la imagen es el "priming" se da en primer lugar y de 55 ms cuando la condición en que la imagen es es el "priming" se da en segundo lugar. Al comparar estas diferencias caso a caso se obtienen resultados negativos en 2 de los casos, únicamente en la condición en que la imagen es el "priming" en primer lugar. Estos datos estarían sugiriendo que, además del rol del cansancio, llevaría más tiempo procesar una palabra que una imagen natural.

Sujeto	IP10-PI10	IPm-PIm	IP90-PI90
IP,PI A	0,032	0,031	0,2046
IP,PI B	0,0924	0,1255	0,3702
IP,PI C	0,046	-0,0075	-0,0326
IP,PI D	0,0476	0,046	0,0326
Prom.	0,0545	0,04875	0,1437
PI,IP E	0,1386	0,1175	-1,1523
PI,IP F	0,063	0,079	-0,0135
PI,IP G	0,031	0,0235	-0,1799
PI,IP H	-0,016	-0,015	-0,3925
PI,IP I	0,0159	0,0315	0,1442
PI,IP J	-0,0159	-0,0465	0,0606
Prom.	0,0361	0,0316667	-0,2555667

Tabla 2. Diferencias en los tiempos de reconocimiento de imágenes y palabras en la mediana y los extremos. Los primeros cuatro participantes realizaron la tarea en que la imagen es el “priming” en primer lugar y los restantes seis en el orden inverso.

Se estudió la distancia intercuartil para las fases Palabra-Imagen (PI75-PI25) e Imagen-Palabra (IP75-IP25), obteniéndose valores de 187ms y 163ms en promedio respectivamente. Al comparar dichas distancias a través del test de rangos signados de Wilcoxon se obtuvo un valor de 0,375.

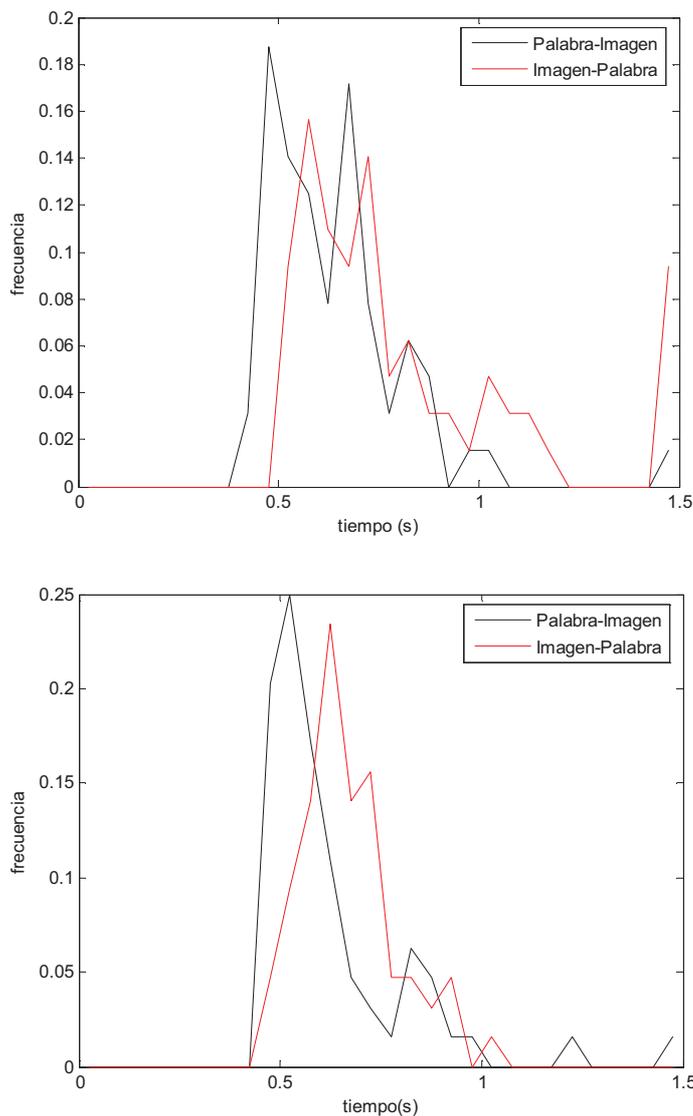


Figura 22. Las gráficas muestran el tiempo de discriminación en las fases de presentación Palabra-Imagen, Imagen-Palabra. La gráfica superior corresponde a una participante que realizó la prueba Palabra-Imagen en primer lugar y la grafica inferior a un participante que lo hizo en el orden inverso.

Se restaron los tiempos correspondientes a los distintos percentiles para las fases Palabra-Imagen e Imagen-Palabra (IP percentil-PIpercentil). Se graficó la dispersión de la mediana y de los extremos de las distribuciones de las diferencias IP-PI para cada percentil.

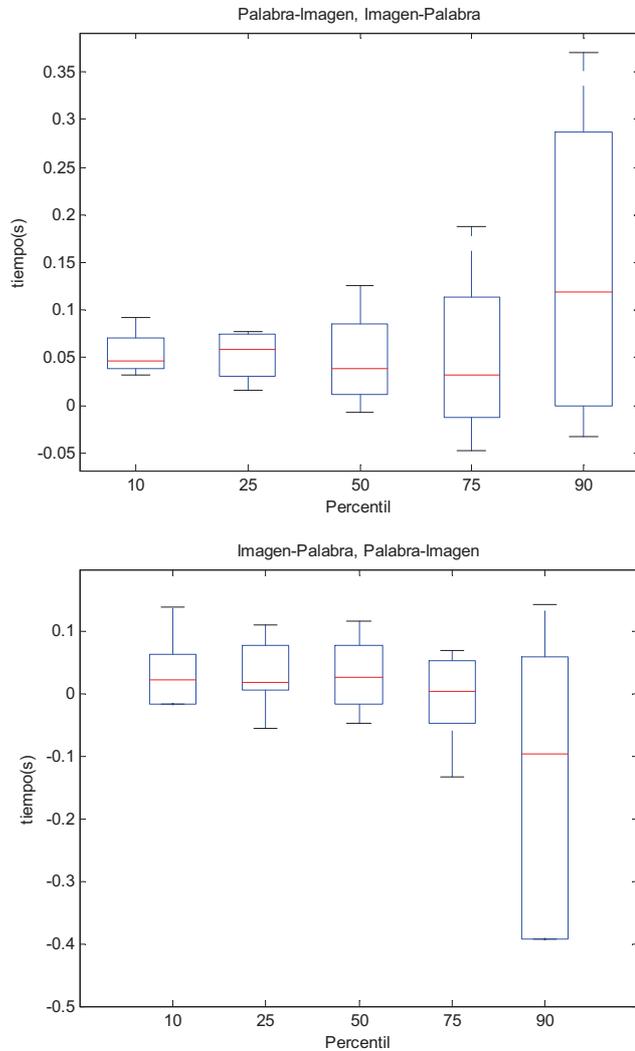


Figura 23. Dispersión de la mediana y de los extremos de las distribuciones de las diferencias IP-PI para cada percentil. En la gráfica superior los participantes realizaron la prueba palabra-imagen en primer lugar y en la gráfica inferior en el orden inverso.

En ambos casos, tanto en el percentil 10 como en el 50, la diferencia tiene el mismo signo. De todos modos, dado que las diferencias encontradas se encuentran en el mismo rango que el error de máquina de la técnica, estos experimentos deberán repetirse, utilizando un procedimiento de mayor resolución.

De las gráficas surge que en el percentil 90 se hace mayor la diferencia entre ambas fases, siendo el tiempo de procesamiento en la prueba Imagen-Palabra mayor cuando esta tarea es presentada en segundo lugar y menor cuando la tarea es presentada en primer lugar.

DISCUSIÓN

En el primer experimento, en el que los participantes detectaron cuando la imagen cambiaba y luego la presencia de una imagen natural dada, se demuestran la existencia de un tiempo cognitivo, al que se le llamó tiempo de identificación en este trabajo. Dicho tiempo fue de 204 ms en promedio. Este resultado es menor que el obtenido por Thorpe et al (250 ms) para las tareas de detección de animales.

Al realizar la segunda prueba del primer experimento en la que los participantes deben hacer clic únicamente cuando ven un perro, varios participantes expresaron que se equivocaron reiteradamente cuando aparecía la imagen de un gato, guiados por sus ojos y su pelaje. Este dato coincide con lo propuesto por Evans y Treisman de que la identificación detallada y localización puede requerir de un procesamiento adicional basado en la atención. Podríamos pensar que los participantes se encontraban en el “modo qué” para realizar la tarea propuesta y al enfrentarse a la presencia de la figura del gato y seguir en ese modo simplemente hacían clic antes de que se diera un procesamiento adicional que les permitiera darse cuenta que estaban viendo un gato y no un perro.

Se estudió la relación entre el tiempo de identificación y la edad, no encontrándose correlación. Es decir que según los datos obtenidos la edad no afectaría a dicho tiempo en la población estudiada.

En el experimento en que se presentaron imágenes alteradas se pudo comprobar que una imagen natural se percibe igual que una imagen con cambio de patrón: se detecta un cambio visual.

En cuanto a la reducción en el contraste, se obtuvieron resultados que coinciden con los obtenidos por J.M. Macé *et al.*: se aprecia una gran robustez en el sistema de reconocimiento de objetos a nivel visual. Se confirma la ley de Pieron para el tiempo de reacción simple y para el de identificación visual: se observa un aumento de los tiempos tanto en la prueba de identificación visual como en la de detección, obteniéndose un tiempo de identificación muy similar al obtenido en condiciones de contraste normal. No se observan diferencias significativas en los tiempos de identificación obtenidos al disminuir el contraste de 25% a 10% y 3%.

Con el segundo experimento, en el que se debe decidir si una palabra coincide con la imagen anteriormente presentada en una primera prueba y luego se debe hacer clic al ver la imagen de un perro, se buscó investigar si existe diferencia entre el tiempo de identificación de imágenes naturales y de lectura de una palabra equivalente. Se pudo observar que existe poca diferencia entre dichos tiempos, 553 ms en promedio para la identificación en base al concepto “perro” y 552 ms en promedio para la identificación

de una palabra. Coincidiendo con la bibliografía consultada se encontró que el “priming” semántico acorta el tiempo de reacción obtenido.

En las gráficas de tiempo de reacción obtenidas para cada participante se puede observar que existe una mayor dispersión en la condición experimental de procesamiento de palabras. Al realizar la diferencia entre los tiempos correspondientes a ambos tipos de procesamiento, percentil a percentil, se pudo apreciar un mayor aumento en los tiempos de procesamiento de palabras luego del percentil 50. Se podría decir que resulta más cansador realizar una tarea en la que la consigna varía, al variar las palabras presentadas, que realizar una tarea con una consigna fija, como lo es reconocer la imagen de un perro entre varias imágenes dadas.

Cuando se grafican los tiempos de identificación en función del tiempo obtenido en el intento anterior se observa claramente cómo cada participante tiene su propio patrón con respecto al cansancio. Hay quienes prácticamente no se cansan y mantienen un tiempo de respuesta muy parejo, hay quienes se cansan con facilidad y presentan tiempos altos espaciados a lo largo del experimento y hay quienes presentan momentos de cansancio, de los que se recuperan y continúan con la tarea con tiempos de reacción similares a los del comienzo. Se observó que aquellas personas que están acostumbradas a trabajar utilizando una computadora mostraron patrones con menos dispersión.

No se encontraron en este experimento diferencias significativas entre el tiempo de identificación de categorías biológicas (perro, gato) o entre las otras categorías (teléfono, silla). Dichos resultados coinciden con lo expuesto por Thorpe (2002) cuando plantea que la categorización visual ultra rápida no es específica a categorías biológicas.

En el experimento en que se presenta una imagen seguida de una palabra y luego una palabra seguida de una imagen y viceversa se puede apreciar una tendencia de aumento del tiempo cognitivo cuando la imagen es seguida de la palabra. A pesar de que las palabras son muy sencillas, y según O Holcombe y Judson, las palabras son procesadas automáticamente por lectores adultos, se podría pensar que lleva más tiempo procesar una palabra que una imagen. De los datos obtenidos surge, al igual que en el experimento anterior, que cada participante muestra su propio patrón de realización de la tarea. En general se observa una mayor dispersión en la condición experimental que se realiza en segundo lugar. Debemos ser especialmente cautos con los resultados obtenidos en este experimento por diversos motivos: se trabajó con una población muy pequeña y se necesitan generar nuevos controles en los que los participantes se enfrenten a coincidencias imagen-imagen (por ejemplo de distintos tipos de perro) y palabra-palabra (por ejemplo con distintos tipos de letra). Además, en estos dos últimos experimentos el error de máquina, de 20 ms debe ser especialmente tenido en cuenta pues las diferencias entre los tiempos de identificación son muy pequeñas. En futuros trabajos se deberá desarrollar un programa que pueda atender a esta situación, generando una mayor discriminación desde el punto de vista visual. De todos modos cabe aclarar que siempre se utilizó la misma máquina y se apreciaron tendencias claras en los distintos resultados obtenidos.

En los primeros experimentos no se consideró necesario entrenar a los participantes pues la bibliografía indica que las velocidades de reacción no pueden ser acortadas por la familiaridad con las imágenes estímulo, incluso luego de 3 semanas de entrenamiento intensivo (Van Rullen & Thorpe, 2001). Sin embargo, en los dos últimos experimentos, en los que se observaron patrones asociados al cansancio de los participantes se deberá realizar un entrenamiento previo y observar si se registran diferencias en los tiempos obtenidos.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que a través de la técnica desarrollada ha sido posible medir el tiempo cognitivo implicado en la discriminación de imágenes naturales, obteniendo resultados similares a los planteados en la bibliografía consultada.

No se encontraron diferencias significativas entre los tiempos obtenidos al realizar tareas de discriminación de imágenes naturales o símbolos en adultos lectores. Será necesario investigar qué sucede con poblaciones de niños de distintas edades. Para ello se deberá tener en cuenta el tema del cansancio y el del error de máquina al diseñar un nuevo protocolo.

No es posible sacar conclusiones contundentes al analizar los resultados obtenidos al presentar una imagen seguida de una palabra y viceversa, pues se pudo observar que el orden en que son presentadas las consignas parece alterar los resultados obtenidos. Un posible modo de perfeccionar la técnica implica presentar 64 imágenes y palabras distintas, buscando además una manera de fraccionar la tarea para minimizar los efectos del cansancio. De hecho, aunque este último experimento muestra diversas limitaciones en la técnica y en los resultados obtenidos, se eligió incluirlo en el presente informe por el gran número de preguntas y perspectivas que se plantean a partir de los datos obtenidos.

En lo referente a la pasantía, inicialmente se planteó como objetivo el demostrar la existencia de una respuesta en términos de potenciales evocados al realizar una tarea de decidir si coinciden una imagen con una palabra escuchada y analizar dicha respuesta en caso de existir. Para ello se montó en el laboratorio el dispositivo de registro correspondiente. Se diseñó también un programa de generación de estímulos. Se pudo registrar la presencia de potenciales al percibir la imagen y el sonido, pero no se alcanzó a registrar potenciales evocados endógenos. Se ha generado pues una nueva línea de investigación en el laboratorio y en lo personal tuve la oportunidad de aprender la técnica de electroencefalografía, así como el desarrollo de experimentos psicofísicos.

PERSPECTIVAS

Se buscará continuar el presente trabajo incluyendo la presencia del electroencefalograma al realizar la tarea, con el objetivo de analizar los potenciales evocados obtenidos.

Futuros proyectos en esta misma línea pueden implicar usar el mismo protocolo del primer experimento para verbos y luego para conceptos abstractos con el fin de analizar posibles diferencias en las velocidades de reacción. También se planea incluir estímulos auditivos.

El segundo experimento, que implica el estudio de las diferencias entre los tiempos de identificación de imágenes naturales e imágenes de símbolos escritos puede ser aplicado para estudiar la construcción del lenguaje, en diversos aspectos: el aprendizaje, comparando los resultados obtenidos por niños con dificultades en el aprendizaje diagnosticadas con los resultados obtenidos por otros niños del mismo nivel escolar; el deterioro y la patología. De encontrarse diferencias se podría convertir en una herramienta sencilla y de fácil y masiva aplicación para una primera evaluación en poblaciones de riesgo. Es en este sentido que pretendo comenzar mi maestría. Un primer paso será el aplicar este experimento a grupos enteros de niños de segundo año escolar, comparando los resultados con el rendimiento escolar de los niños.

BIBLIOGRAFIA

Bacon-Macé, N., Kirchner, H., Fabre-Thorpe, M. & Thorpe, S.J. (2007) Effects of Task Requirements on Rapid Natural Scene Processing: From Common Sensory Encoding to Distinct Decisional Mechanisms. *Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance*, **33**, 1013-1026.

Bonnet, Claude (1994) Psicofísica de los tiempos de reacción: teorías y métodos. *Revista Latinoamericana de Psicología*. **26**, 431-444.

Farah, M., Humphreys, G.W. & Rodman, H.R. (1999) Object and Face Recognition. En Zigmond, M.J., Bloom, F.E., Landis, S.C. Roberts, J.L. & Squire, L.L. (Editores) *Fundamental Neuroscience* (Cap. 52). San Diego, California: Academic Press.

Grossman, M, Koenig, P, et al (2003) Neural basis for semantic memory difficulty in Alzheimer's disease: an fMRI study. *Brain*, **126**, 292-311.

Holcomb, Phillip J. (1993) Semantic "priming" and stimulus degradation: Implications for the role of the N400 in language processing. *Psychophysiology*, **30**, 47-66.

Macé M., Thorpe S.J. & Fabre-Thorpe, M (2005) Rapid categorization of achromatic natural scenes: how robust at very low contrasts? *European Journal of Neuroscience*, **21**, 2007-2018.

Maiche, A. Fauquet, J, Estaún, S & Bonnet, C. (2004) Tiempo de reacción: del cronoscopio a la teoría de ondas. *Psicothema*. **16**, 149-155.

O Holcombe A., Judson J. (2007) Visual binding of English and Chinese word parts is limited to low temporal frequencies. *Perception*, **36**, 49-74.

Patterson, K., Nestor, P.J. & Rogers T.T. (2007) Where do you know what you know? The representation of semantic knowledge in the human brain. *Nature Publishing Group*, **8**, 976-987.

Pessoa, L., Tootell, R. & Ungerleider, L.G. (2008) Object and Face Recognition. En Squire, L., Berg, D., Bloom, F., Du Lac, S., Ghosh, A. & Spitzer, N. (Editores), *Fundamental Neuroscience* (Cap. 46).

Soler, O., Aparici, M., Maiche, A. & Estaún, S. (2005) Tiempo de Reacción en una Tarea Cognitiva: Exploración del efecto nocturnidad/diurnidad. En Universidad de Valencia (Ed.), *Atención y Pensamiento V1* (pp. 151-160). Valencia.

Thorpe, S.J. (1991) Image processing by the Human Visual System. In G. Garcia & I. Herman (Eds.), *Advances in Computer Graphics VI* (pp. 309-342). Berlin: Springer-Verlag.

Thorpe, S.J. (2002) Ultra-Rapid Scene Categorization with a Wave of Spikes. En H.H. Bulthoff et al. (Eds.) (pp. 1-15). Berlin

Thorpe, S.J. & Fabre-Thorpe Michele (2001) Seeking Categories in the Brain. *Science*, **291**, 260-262.

Thorpe, S., Fize, D. & Marlot, C. (1996) Speed of processing in the human visual system. *Nature*, **381**, 520-522.

VanRullen, R., Thorpe SJ (2001) Is it a bird? Is it a plane? Ultra-rapid visual categorization of natural and artificial objects. *Perception*, **30**, 655-668.

**Informe de Pasantía
Licenciatura en Biología Humana**

**Modulación de la latencia
de la percepción visual.**

Estudio psicofísico

*Sección Biomatemática
Laboratorio Neurociencias*

Tutor: *Leonel Gomez*
Estudiante: *Sergio Podestá*

Noviembre 2009

INDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	4
3. FUNDAMENTACIÓN Y ANTECEDENTES	6
3.1. Columnas de Orientación de la Corteza Visual Primaria	7
3.2. Conexiones Horizontales	8
3.3. Procesamiento del movimiento	9
3.4. Tiempos de Reacción	10
4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	13
4.1 Hipótesis	13
4.2 Objetivo general	14
4.3 Objetivos específicos	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1 Método General	15
5.2 Experimento 1:	18
5.3 Experimento 2:	19
5.4 Experimento 3:	20
6. RESULTADOS	22
7. DISCUSION	28
8. CONCLUSIONES	37
9. AGRADECIMIENTOS	39
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. RESUMEN

Estudios recientes sugieren que las conexiones horizontales de largo alcance en la corteza visual primaria participan en la integración espacial y temporal. Diversas investigaciones indican que la propagación de la actividad a través de conexiones horizontales de largo alcance es lenta, con escalas de tiempo comparables a las escalas perceptuales involucradas en el procesamiento del movimiento.

Usando un modelo experimental psicofísico, basado en el estudio de los tiempos de reacción, exploramos algunas de las implicaciones de esta dinámica lenta. Basamos nuestro estudio en que la demora en la percepción de un estímulo estático mostrado brevemente, puede ser modulada por una o más pre-estimulaciones presentadas unos pocos ms antes, en el entorno cercano a su campo receptivo.

Reportamos varios experimentos mostrando que un estímulo consistente en un parche gaussiano circular puede ser percibido más tempranamente o más tardíamente dependiendo de las características de las estimulaciones previas. Mostramos que el tiempo necesario para detectar el estímulo puede alterarse cuando su presentación es precedida por un objeto móvil que converge al mismo punto, modificando sensiblemente el tiempo de reacción del observador, presumiblemente debido a una modulación de la latencia en la percepción.

Se analizó este fenómeno y sus posibles consecuencias en la modulación de la latencia de respuesta, como función de la configuración espacio-temporal de los estímulos visuales.

Proponemos que las interacciones dinámicas entre las señales horizontales y verticales en V1 pueden dar cuenta de las modulaciones en la latencia de respuesta encontradas y explicar su relación con la configuración espacio-temporal de los estímulos previos (orientación relativa, separación espacial e intervalo temporal).

2. INTRODUCCIÓN

Experimentos electrofisiológicos y psicofísicos reportan la existencia de células de la corteza visual primaria pertenecientes a distintas hipercolumnas y de la misma especificidad funcional, que interactúan a través de conexiones horizontales de largo alcance y velocidad de propagación lenta.

Estas conexiones han sido relacionadas al procesamiento del movimiento. Georges y colaboradores describieron como un parche gabor que se desplaza en una secuencia de movimiento aparente, parece ser mucho más rápido cuando su orientación está alineada con la trayectoria del movimiento que cuando está en un ángulo con él (Georges et al., 2002). Por otra parte, Maiche y sus colegas postularon que dos objetos en movimiento aparente con dirección de colisión, sumarían sus efectos de pre-activación provocando un acortamiento de la latencia para la detección de un blanco móvil, y que esta disminución en la latencia de percepción es capaz de aumentar el efecto flash-lag. (Maiche et al., 2007).

El presente trabajo consiste en la realización de un estudio usando técnicas psicofísicas, basado en tiempos de reacción, que intenta profundizar en el conocimiento de estos mecanismos de pre-activación y su posible rol en el procesamiento visual. Se busca progresar en la comprensión de los componentes que se encuentran en el sustrato de diversos procesos de percepción visual y que han sido relacionados con la integración de contornos (Cass y Alais, 2006), estimación de la velocidad (Georges et al., 2002) y diversos efectos perceptuales como el movimiento de línea ilusorio (Hikosaka et al., 1993, Steinman et al., 1995) y el flash lag. (Maiche et al., 2007). Estos últimos investigadores estudiaron estos mecanismos de pre-activación tomando como modelo el efecto flash lag, en este fenómeno de percepción un flash luminoso adyacente a un objeto en movimiento continuo se percibe por detrás del objeto. Un cambio repentino sin correlación alguna en el medio ambiente no puede ser predicho, pero un objeto en movimiento en el campo visual permite inferir su posible futura posición. Una posible explicación podría estar dada por un acortamiento de la latencia de percepción para el objeto en movimiento que no ocurre para un objeto que aparece en forma repentina. Estos científicos postularon que si existen mecanismos perceptuales de facilitación,

implicados en etapas tempranas del procesamiento del movimiento capaces de promover este acortamiento de la latencia, entonces dos movimientos continuos podrían sumar sus efectos de preactivación, obteniéndose un acortamiento de latencia todavía mayor.

Los efectos mencionados revelan mecanismos que podrían estar implicados en las primeras etapas del procesamiento del movimiento y que aportarían una explicación plausible de los mencionados fenómenos perceptivos (Jancke et al., 2004).

3. FUNDAMENTACIÓN Y ANTECEDENTES

Nuestra perspectiva de análisis implica considerar que el sistema visual ha evolucionado para favorecer la supervivencia. Si partimos de la premisa de que el sistema nervioso ha sido moldeado por la evolución, no encontramos motivo para situar el procesamiento visual fuera de este contexto, desde el punto de vista evolutivo resulta razonable aceptar la selección de circuitos neuronales que resuelvan de manera eficaz y económica problemas con valor adaptativo. Así por ejemplo, la velocidad de un movimiento es una información sustancial para cualquier organismo que deba interactuar con objetos móviles, convirtiendo al procesamiento de la velocidad en una necesidad ecológica: atrapar una presa, evitar un obstáculo o predecir una colisión requieren un eficiente procesamiento de los estímulos visuales provenientes de un objeto en movimiento (Georges et al., 2002).

La respuesta sensorial a eventos físicos deben ser transformados en procesos que consumen tiempo, los inevitables retardos neurales deben ser resueltos de por el sistema para dar una respuesta adecuada. ¿Cómo resuelve el sistema nervioso estas demoras? ¿Cuáles son los mecanismos que permiten superar las limitaciones intrínsecas del sistema?

El sistema visual es el encargado de extraer dicha información a través de una serie de complejos mecanismos que poco a poco la investigación ha ido develando en su forma y funcionamiento. Sin embargo, nuestro conocimiento de algunos de los aspectos fundamentales de la percepción visual del movimiento –la codificación de la información sobre la velocidad y sobre la dirección– es aún incompleto.

Más allá de toda la investigación psicofísica y fisiológica de las últimas décadas, los métodos por los que el sistema visual procesa estos estímulos están todavía poco claros (Dror, O'Carroll y Laughlin, 2001).

3.1. Columnas de Orientación de la Corteza Visual Primaria

La corteza visual primaria elabora la información elemental procedente de la retina al menos en tres formas distintas: 1) Las columnas de orientación descomponen cada parte del campo visual en cortos segmentos lineales de orientación diferente. 2) El procesamiento del color que tiene lugar en las regiones llamadas *manchas*. 3) Las columnas de predominio ocular, paso necesario para la percepción de la profundidad. (Kandel et al., 2001).

La distribución anatómica de las columnas de orientación se definió primero mediante estudios electrofisiológicos, haciendo marcas en la corteza cerca de las células que se activan por estímulos de una orientación determinada. Hubel y Wiesel detallaron una cartografía de columnas adyacentes, efectuada utilizando penetraciones tangenciales con microelectrodos, revelando una organización precisa con una desviación ordenada en el eje de orientación desde una columna a la siguiente. Al conjunto de columnas que responde a un ciclo completo de cambios de orientación situadas en una región concreta del espacio les denominaron *hipercolumnas* y cada una de ellas ocupa alrededor de 1 mm² (Hubel y Wiesel 1959, 1962, 1968 y 1979).

Más tarde esta disposición anatómica se definió inyectando en el encéfalo 2-desoxiglucosa (análogo de la glucosa) marcada con un isótopo radiactivo. Las células metabólicamente activas captan el isótopo marcado, lo que permite detectarlas cuando los cortes de la corteza se colocan sobre placas de rayos x. (Hubel et al., 1977)

En la actualidad estas columnas de orientación pueden ser observadas directamente en la corteza cerebral viva. Utilizando un colorante sensible al voltaje y una cámara de gran sensibilidad que puede detectar el patrón de orientación de las columnas activas e inactivas cuando se presenta un estímulo de luz con un eje de orientación específico (G. Blasdel 1992a y 1992b).

3.2. Conexiones Horizontales

Investigaciones realizadas inyectando peroxidasa en la corteza del mono revelaron que estos sistemas orientados verticalmente se comunican unos con otros por medio de *conexiones horizontales*. Los axones colaterales de cada célula piramidal de las capas 3 y 5 siguen largos trayectos paralelos a las capas y dan origen a grupos de terminaciones axonales con intervalos regulares de anchura similar a la de una hipercolumna (McGuire et al., 1991).

Otra prueba de la existencia de estas conexiones horizontales se obtuvo inyectando 2-desoxiglucosa radiomarcada y microperlas marcadas con fluorescencia en una columna que contenía células que respondían a una orientación específica. Los axones terminales captaron las microperlas en el lugar donde se inyectaron y las transportaron de vuelta a los somas celulares. En cortes tangenciales a la piamadre, tanto el patrón global obtenido de las células marcadas con microperlas como el marcado con 2-desoxiglucosa reveló una organización similar a la descrita por McGuire y colaboradores (Gilbert y Wiesel, 1989).

Por tanto, la organización funcional de la corteza visual consta de dos grupos de conexiones: una vertical, formada por columnas funcionales que se extienden a través de las distintas capas de la corteza, y otra horizontal, que conecta las columnas funcionales cuyas respuestas tienen propiedades similares y que pueden integrar información a lo largo de varios milímetros de la corteza. La consecuencia es que un estímulo procedente de fuera del campo receptivo de una célula puede también estimularla (Kandel et al., 2001).

Se ha demostrado que estímulos proyectados fuera del campo de descarga de una célula de V1 generan una modulación de su potencial de membrana, que puede ser excitatorio o inhibitorio, con una latencia que aumenta linealmente con la distancia (Bringuier et al., 1999, Chavane et al., 2000).

Otras investigaciones, realizadas sobre el efecto en el aumento de la velocidad percibida, han sido relacionadas con la dinámica de la actividad dentro del plexo de conexiones horizontales de largo alcance y está apoyado tanto por un modelo computacional (Seriès et al., 2002) como por registros electrofisiológicos realizados en la corteza V1 del gato (Jancke et al., 2004).

Por último, aunque en esta investigación nos centramos en los procesos iniciales de la visión no se debe perder de vista la posibilidad de que también estén implicadas influencias provenientes desde regiones más altas en la jerarquía del procesamiento (Hupé et al., 2001)

3.3. Procesamiento del movimiento

En la visión el mundo se experimenta como un todo, atributos como movimiento, profundidad, forma y color se conjugan en una sola imagen visual, sin embargo, se ha encontrado en monos un área específica, en el borde de la corteza parietal, en el área temporal media (TM), dedicada al procesamiento del movimiento, donde casi todas las células tienen selectividad direccional y la forma o el color del estímulo sólo afecta una fracción de estas células. Al igual que en V1, en TM existe un mapa retinotópico del campo visual contralateral, pero sus campos receptivos son unas diez veces mayores. Las células con especificidad direccional similar se organizan en columnas verticales y cada parte del campo visual está representada por un conjunto de columnas en las que las células responden a movimientos de direcciones diferentes, una organización similar a la observada en V1. Esta zona temporal media recibe fundamentalmente aferencias de la vía M (proveniente de las células magnocelulares del núcleo geniculado lateral) que se proyectan desde las capas C4 α y 4B de V1 y también desde V2. Puede identificarse además una vía que proviene desde las capas parvocelulares del núcleo geniculado lateral que se proyecta a través de la capa C4 β y V2, sin embargo no sería esta la vía predominante (Kandel et al., 2001).

En el encéfalo humano esta zona dedicada al movimiento se ha detectado mediante exploraciones PET que la ubican en la unión de las cortezas temporal, parietal y oxipital (Zeki et al., 1991).

En general pensamos en el movimiento como un objeto que se desplaza en el campo visual y lo distinguimos fácilmente del fondo inmóvil. Sin embargo sucede que vemos objetos en movimiento no porque se muevan en la retina sino porque seguimos el objeto con movimientos oculares, la imagen permanece estacionaria en

la retina pero percibimos el movimiento porque son los ojos los que se mueven. El movimiento entonces puede percibirse de dos formas: Cuando los ojos siguen al objeto la imagen siempre ocupa el mismo lugar en la retina y la información de movimiento del objeto proviene del movimiento de los ojos o la cabeza. Cuando los ojos se mantienen inmóviles la imagen del objeto atraviesa la retina y la información proviene de la activación secuencial de los receptores de la retina. En este caso el movimiento en el campo visual se detecta comparando la posición de las imágenes registradas en diferentes momentos. Como la mayoría de las células del sistema visual son extremadamente sensibles a la posición de la retina y pueden distinguir fenómenos separados en el tiempo por sólo 10 a 20 ms. las células del sistema visual son capaces de extraer información sobre el movimiento a partir de la posición de la imagen en la retina, comparando sus posiciones sucesivas (Kandel et al., 2001). Esta activación secuencial de los receptores de la retina producida por una imagen que la atraviesa, puede ser originada no por un objeto en movimiento sino por estímulos que se presentan en posiciones sucesivas causando un movimiento aparente. Este puede ser tan convincente como el real, cuando dos luces en posiciones cercanas se encienden y se apagan en intervalos adecuados se percibe una sola luz que se mueve entre dos puntos (Hochberg, 1978)

3.4. Tiempos de Reacción

Los estudios basados en tiempo de reacción (TR), definido como el tiempo que media entre el inicio de un estímulo y la producción de una respuesta (Bonnet 1994), se basan en la premisa de que los estímulos que provocan la misma respuesta discriminativa, producirán iguales TR (Cattell, 1902) y han sido largamente utilizados en experimentos psicofísicos (De Jaeger 1865, Donders 1868/1969, Exner 1873, Cattell 1886). Se ha destacado su capacidad de aportar información acerca de las propiedades de etapas tempranas del procesamiento de la información, a través de diversas tareas psicofísicas en la visión (Mateeff et al., 1999, Pins y Bonnet 1996, 1997, Tynan y Sekuler 1982).

El TR disminuye si se advierte al sujeto antes de que aparezca el estímulo (Wundt, 1903), se denomina *período preparatorio* al intervalo entre la señal y el

estímulo. Para evitar los efectos de anticipación y de automatización de la respuesta se acostumbra variar aleatoriamente el intervalo entre señal y estímulo (Klemmer, 1956). Este intervalo debe ser lo suficientemente acotado como para que el sujeto se encuentre preparado para emitir la respuesta pero, a la vez, no debe ser tan extenso como para provocar un descenso en la atención (Chocholle, 1972).

Al trabajar con TR no debemos perder de vista que una medida psicofísica combina efectos de diferentes factores y, por lo tanto, no se debe asumir la respuesta observada como la salida directa del sistema sensorial (Green y Swets, 1966).

Deberemos aceptar que esta puede verse afectada por diversas causas. El efecto que produce la fatiga determina un aumento en los TR (Forbes, 1945). En este sentido es aconsejable controlar la duración de cada una de las sesiones que realiza un sujeto. Si bien estos elementos varían para cada sujeto, como regla general, se recomienda que las sesiones no superen los 30 minutos (en nuestro estudio hemos estimado el tiempo de cada sesión en 20 minutos). Asimismo, uno de los factores orgánicos que pueden influir en los TR es la hora del día en que se realiza la prueba. Según Kleitman, Titelbaum y Feiveson los TR disminuyen por la mañana y aumentan pasado el mediodía siguiendo las variaciones de la temperatura corporal (Kleitman et al., 1935). Sin embargo, otros autores (Elbel, 1939) proponen que la variación de TR en función de la hora del día responde a patrones más complejos.

Al realizarse experiencias en las que se recompensaba al sujeto por su desempeño se evidenció que la motivación era un elemento que afectaba significativamente los TR (Owen, 1959). Factores emocionales también pueden incidir en los TR, sujetos emotivos obtienen mayor variabilidad en sus datos que los sujetos con menor grado de emotividad. (Washburn et al., 1929)

Es necesario tener en cuenta que el entrenamiento de los sujetos reduce en buena medida la influencia de estos factores en el TR y estabiliza la respuesta del sujeto, disminuyendo su rango de variación. Por esta razón, resulta imprescindible para la metodología psicofísica basada en el análisis de los TR disponer de sujetos

altamente entrenados. De todas maneras, el entrenamiento minimiza la variabilidad proveniente de estos factores, pero no la anula. La variabilidad en los TR que suele presentarse entre diferentes individuos (sin deficiencias sensoriales) se le atribuye más al criterio de respuesta que a componentes relativos a la sensibilidad del sistema (Bonnet y Dresp, 2001). Consideraremos entonces que el entrenamiento provoca un descenso en los TR que se corresponde con una optimización del criterio de respuesta (Bonnet y Link 1998). Sin embargo, en sujetos entrenados, la variación intra-individuo (variación del criterio de respuesta entre diferentes sesiones) es aleatoria y consideraremos la media de los TR observados como una buena estimación (Bonnet y Link, 1998).

A todo esto debemos agregar que no se debe descartar la posibilidad de que los TR pueden ser afectados incluso por factores cognitivos de más alto nivel (Bonnet y Dresp, 2001).

El TR en respuesta a la presentación de un estímulo en un sitio prefijado es una conducta automática del sujeto que depende de la información sensorial, pero que no obedece a elementos de alto nivel ligados a la emisión de un juicio. Por otra parte el componente motor del tiempo de reacción, como todos los procesos biológicos, consume un tiempo que es estadísticamente variable de un sujeto a otro e incluso intra-sujeto pero que puede considerarse estadísticamente constante, esto nos permite asumir que la duración media de los procesos motores no varía a través de los diferentes ensayos (Miller y Low, 2001).

4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Si se plantean condiciones experimentales que no contengan elementos que impliquen una decisión y el componente motor del TR puede considerarse estadísticamente constante (como se señaló en el capítulo anterior), entonces podemos asumir que cualquier modificación de la latencia de respuesta puede ser atribuida a los procesos del componente perceptivo.

Los trabajos realizados por Maiche y sus colaboradores en 2007 con el efecto flash-lag, en los que aumentaron este efecto añadiendo un segundo objeto en movimiento continuo, fueron basados en que este tipo de predicción podría hacerse por medio de la pre-activación de zonas adyacentes de la corteza visual en la dirección del objeto en movimiento.

La propagación de la actividad en el cortex visual vía conexiones horizontales de largo alcance entre modulos de características similares de procesamiento ha sido descrita por Gilber & Wiesel (Gilbert y Wiesel, 1989)

4.1 Hipótesis

Basados en estas ideas proponemos que, si existe un mecanismo de pre-activación, la latencia de respuesta a un estímulo presentado en un determinado sitio del campo receptivo visual debería reducirse cuando este es precedido por la estimulación de zonas vecinas.

Aunque no se pueden descartar mecanismos de integración procedentes de áreas superiores, esta modulación puede ser explicada por la actividad conducida por las conexiones horizontales de largo alcance y depende de la configuración espacio-temporal de dichos estímulos.

4.2 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es profundizar en el entendimiento de los mecanismos subyacentes a la percepción del movimiento, centrándonos especialmente en aquellos relacionados con etapas tempranas del procesamiento de la información sensorial, basados en métodos experimentales psicofísicos.

4.3 Objetivos específicos

- 1) Evidenciar cambios en la latencia perceptiva utilizando técnicas psicofísicas.
- 2) Estudiar como esa latencia puede variar en función de los cambios en la configuración del estímulo.
- 3) Consolidar técnicas basadas en tiempos de reacción con el fin de detectar variaciones de latencia perceptiva.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Método General

El trabajo fue llevado a cabo en la Sección de Biomatemática de la Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo-Uruguay, donde se realizó tanto el desarrollo del diseño experimental como las pruebas y análisis de los datos.

Los estímulos fueron presentados en un monitor VIEWSONIC 17" trabajando con una resolución de 1024 x 768 pixeles y a una frecuencia de 60 Hz controlado por un PC P4, 3 Ghz corriendo MATLAB (Mathworks Inc.) y Psychophysics Toolbox (Pelli, 1997).

Participaron tres sujetos entrenados en experimentos visuales de psicofísica con visión normal o corregida a la normal. Todos los sujetos fueron instruidos acerca de los experimentos que iban a realizar y aceptaron sus condiciones firmando un consentimiento informado. Fueron entrenados para mantener la mirada en un punto de fijación de manera de mantener constante la proyección retiniana de los estímulos. La visión fue siempre monocular y en todos los casos el ojo utilizado fue el derecho. Para mantener una distancia fija y ayudaren a mantener la mirada en el punto de fijación se utilizó como apoyo una mentonera ajustable (KJ-1000, INDO Inc.).

Las pruebas se realizaron en un cuarto oscuro con el fin de minimizar la incidencia de estímulos ajenos al experimento y mantener constantes las condiciones de luminancia.

El estudio está basado en la medición de los TR en respuesta a un estímulo luminoso presentado en el monitor.

La posición de dicho estímulo está prefijada y es conocida por el observador.

Todos los experimentos constan de dos clases de estímulos: 1) Los “estímulos blanco” u objetivo, que consisten en parches gaussianos circulares (de orientación neutra) y son a los que el sujeto debe responder en el menor tiempo posible. 2) Los que preceden a los “estímulos blanco” que consisten en parches gabor (perfil de luminancia espacial sinusoidal modulado por una función gaussiana) (en adelante “*primers*”), estos se presentan en posiciones cercanas al sitio donde se

desplegará el estímulo blanco con el fin de evaluar si producen una modulación de la latencia en la percepción del mismo.

En el centro de la pantalla se presenta una cruz tenue usada como punto de fijación. Sobre este se presenta un estímulo brillante (estímulo blanco) que consiste en un parche gaussiano de configuración espacial neutra (igual ancho que largo) con una duración muy corta (16 ms) y al cual el observador deberá responder en el menor tiempo posible pulsando una tecla. El estímulo blanco, que aparece centrado en la fovea, está precedido en todos los casos por una secuencia de movimiento aparente horizontal, que converge hacia la posición en que se presentará el estímulo blanco, generada por tres parches gabor orientados en la dirección del movimiento (*primer horizontal*). El tamaño de cada estímulo (sea gabor o gaussiano) así como la separación espacial entre los mismos es de 1.3° de ángulo visual (Fig 1).

Cada estímulo tiene un tiempo de permanencia en pantalla de 16 ms. y la separación temporal entre el inicio de un estímulo y el siguiente es de 32 ms. Para evitar que el observador anticipe su respuesta se añade al inicio de cada ensayo un intervalo (t_0) cuya duración varía en forma aleatoria.

Podemos distinguir entonces cuatro intervalos:

t_1 : desde t_0 a t_0+16 ms

t_2 : desde t_0+48 a t_0+64 ms

t_3 : desde t_0+96 a t_0+112 ms

t_4 : desde t_0+144 a t_0+160 ms

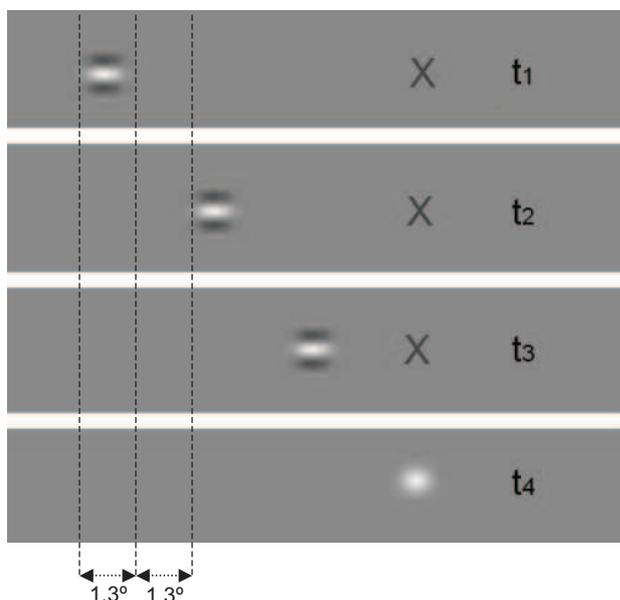


Figura 1. Secuencia de movimiento aparente (*primer horizontal*) generada por un parche gabor que se despliega en tres posiciones cada vez más cercanas al centro del campo receptivo.

El movimiento aparente converge hacia el punto de fijación (cruz tenue) sobre la que se despliega el estímulo blanco.

Tanto el tamaño de los estímulos como la distancia entre ellos es de 1.3° de ángulo visual.

El tiempo de permanencia en pantalla de cada estímulo es de 16 ms. y se encuentran separados por un intervalo de 32 ms.

A fin de evitar que los sujetos se anticipen a la aparición del estímulo usando como guía el *primer horizontal*, el estímulo se presenta sólo en cierto número de ensayos escogidos al azar, en un diseño conocido como “go – no go”. En este esquema, en algunas ocasiones escogidas en forma estocástica, el estímulo no se presenta; este es presentado en continuidad con el movimiento aparente del primer, al suprimirse su despliegue se provoca la sensación de que el movimiento se detiene antes de llegar al punto de fijación, como el estímulo no se presenta el sujeto no debe responder (no go). Como consecuencia el sujeto no puede utilizar al *primer* como guía, debiendo esperar necesariamente la presentación del estímulo para responder.

5.2 Experimento 1:

Estudio del TR en función del número de *primers*.

En este experimento comparamos los TR en la detección del estímulo cuando este es precedido además por una secuencia de movimiento aparente vertical.

Previo al estímulo y con el fin de producir facilitaciones o supresiones que alteren el TR, se presentan en forma aleatoria cuatro situaciones experimentales con: cero, uno, dos o tres parches gabor orientados verticalmente (*primer vertical*) (Fig. 2).

Se incluyó en el experimento una situación en la que el estímulo sólo es precedido por el *primer horizontal* (situación a), así en cada experimento obtenemos la media del TR al estímulo presentado sin perturbaciones. Tomaremos este como valor de referencia y lo utilizaremos para normalizar los datos de los distintos experimentos.

El *primer vertical* consta de las mismas condiciones espacio-temporales que las definidas para el *primer horizontal* pero está rotado 90°.

Para cada experimento se realizaron 200 ensayos, 50 por cada situación experimental. Cada sujeto realizó un mínimo de 4 experimentos.

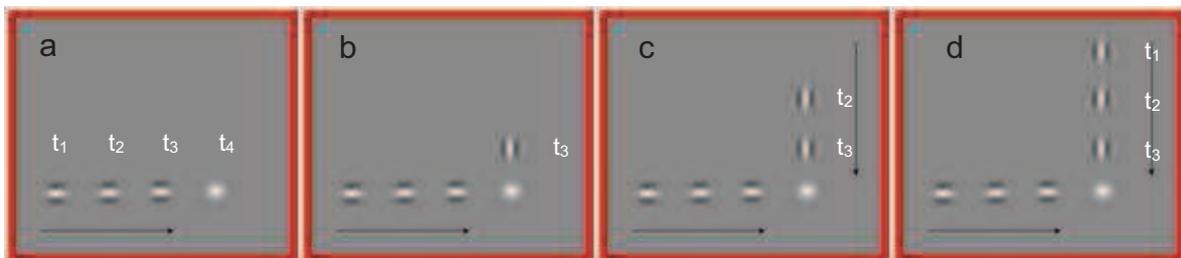


Figura 2. Cuatro situaciones experimentales posibles del experimento 1. El *primer horizontal* aparece en todos los ensayos. a) en esta situación experimental no se presenta el *primer vertical* (situación control), la flecha indica la dirección del movimiento aparente del *primer horizontal*. b) El *primer vertical* consiste en un solo parche gabor que aparece en el instante t_3 . c y d) El *primer vertical* formado por 2 y 3 parches gabor respectivamente genera un movimiento aparente que converge al centro del campo receptivo. Todos los parches gabor están orientados en la dirección del movimiento.

5.3 Experimento 2:

Estudio del TR en función de la orientación del *primer*.

En el experimento 1 los *primers* se presentaron con una orientación espacial colineal a la dirección del movimiento, el *primer horizontal* está compuesto por parches gabor de orientación espacial horizontal y el *primer vertical* está compuesto por parches gabor de orientación vertical.

En este experimento mantenemos las condiciones del experimento anterior pero cambiamos la orientación de los parches gabor que conforman el *primer vertical* de modo que esta sea ortogonal a la dirección del movimiento, es decir que el *primer vertical* sigue generando una secuencia de movimiento aparente vertical pero la configuración espacial de los parches gabor es horizontal (Fig. 3).

Para cada experimento se realizaron 200 ensayos, 50 por cada situación experimental. Tres sujetos realizaron este experimento y cada uno lo repitió 4 veces.

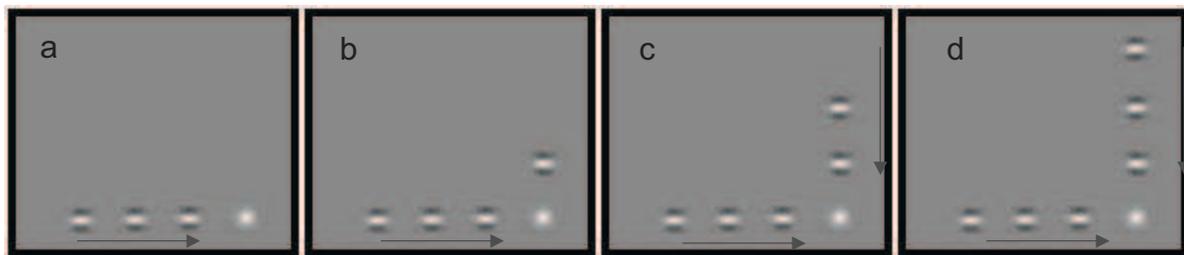


Figura 3. Experimento 2. El diseño experimental es análogo al del experimento 1, con la única diferencia que la orientación espacial de los parches gabor del *primer vertical* es ortogonal a la dirección del movimiento aparente, los parches gabor tienen orientación espacial horizontal.

5.4 Experimento 3:

Estudio del TR en función del tiempo y la distancia del *primer* al estímulo.

En el tercer experimento exploramos sistemáticamente la variación en el tiempo de reacción en función del tiempo y la distancia que hay entre el estímulo y un *primer vertical* compuesto por un solo parche gabor (*primer vertical simple*). Para ello hicimos que el *primer vertical simple* se presentara a tres distancias y tres tiempos distintos prefijados, componiendo un total de nueve situaciones experimentales que fueron presentadas al sujeto en forma estocástica (Fig. 4).

Cada observador realizó 405 ensayos en cada experimento, 45 por cada situación experimental. El resto de los parámetros se mantuvieron igual que en los experimentos 1 y 2.

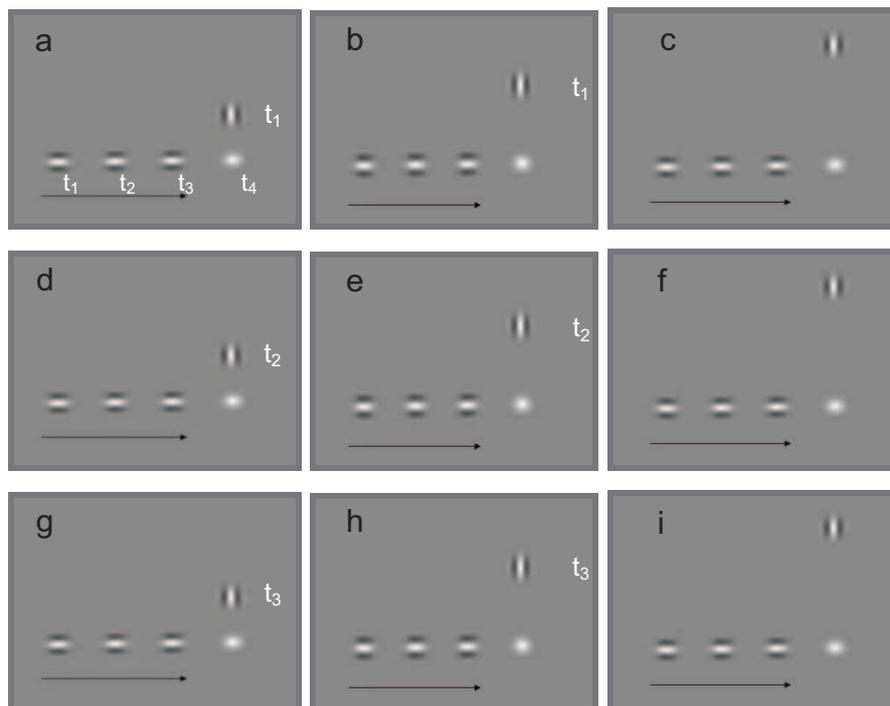


Figura 4. Las 9 situaciones experimentales. Mientras que el *primer horizontal* continúa generando un movimiento aparente hacia el estímulo, el *primer vertical* se compone de un solo parche gabor que puede aparecer en 3 posiciones y en 3 instantes diferentes. Cada fila simboliza una posición espacial distinta pero el mismo instante temporal. Inversamente cada columna representa una misma posición espacial pero en un instante diferente. Las situaciones **a**, **b** y **c** (fila superior) corresponden a tres posiciones espaciales distintas del *primer vertical* pero todas en el mismo instante t_1 . Inversamente,

las situaciones **a**, **d** y **g** (columna de la izquierda) corresponden a la misma posición espacial pero en tres instantes diferentes t_1 , t_2 y t_3 .

6. RESULTADOS

Maiche y colaboradores en sus trabajos con el efecto flash-lag utilizaron dos objetos en movimiento en dirección de colisión. Estos objetos tenían una configuración espacial neutra y su movimiento aparente no presentaba variaciones en los diferentes ensayos, debido a que el objetivo no era estudiar la incidencia de diferentes estímulos sino la existencia o no de una modulación del efecto. Como nuestra intención es estudiar la influencia que pueden tener estos estímulos previos introdujimos un *primer vertical* con cierta variabilidad controlada.

Al analizar los resultados nos enfrentamos con la dificultad que presenta la variabilidad intra-sujeto y la variabilidad inter-sujeto. Con el fin de que sean comparables y presentar los datos de modo que permitan realizar un análisis válido, los datos fueron normalizados hallando el cociente entre el TR de cada situación y el valor de referencia de cada experimento. Los valores presentados en este capítulo no representan el TR en si mismo sino el cociente entre este y el valor de referencia, de modo que los valores numéricos que se expresen no serán unidades temporales de un sistema métrico sino unidades arbitrarias (UA).

Los resultados del experimento 1 se presentan graficados en la figura 5. Se muestran los resultados de cada sujeto en gráficos independientes, además se discrimina el resultado de cada experimento (línea punteada) y el promedio de los experimentos de cada sujeto (línea roja gruesa).

En todos los gráficos se observa un acortamiento en el TR cuando el *primer vertical* se compone de un parche gabor, frente a la situación control. Este efecto se mantiene para un *primer vertical* de dos parches y tiende a disminuir cuando se compone de tres parches, situación en la que, en ocasiones, el TR se hace aun mayor que el de la situación control.

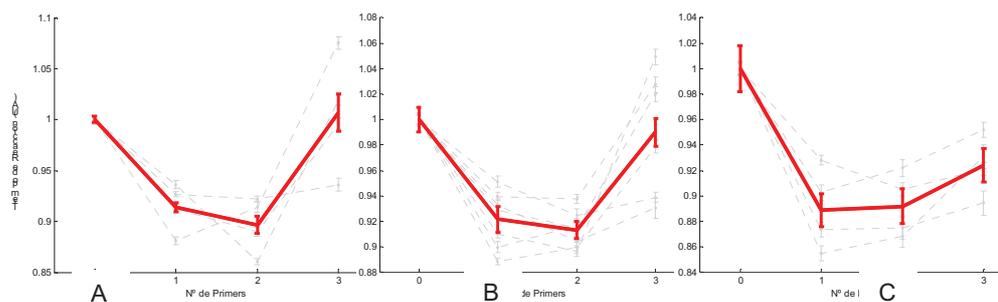


Figura 6. Gráficos de los resultados del experimento 1. Variación del Tl (UA) en función de la composición del *primer vertical* (0, 1, 2, 3 parches gabor). Se muestran tres gráficos, uno para cada sujeto. Cada línea punteada representa el promedio de los 200 ensayos que compone cada experiencia, las líneas gruesas representan el promedio de todos los experimentos realizados por cada sujeto.

En estos gráficos se aprecia claramente la variabilidad inter-sujeto (variaciones entre los gráficos A, B y C) así como la variabilidad intra-sujeto, observable comparando cada una de las curvas (líneas punteadas) dentro de un mismo gráfico.

En este experimento los *primers* se presentaron con una orientación espacial colineal a la dirección del movimiento, el *primer horizontal* está compuesto por parches gabor de orientación espacial horizontal y el *primer vertical* está compuesto por parches gabor de orientación vertical.

Para estudiar los efectos de la orientación del *primer* diseñamos un experimento en el que se mantienen las condiciones generales del experimento 1 pero cambiamos la orientación de los parches gabor que conforman el *primer vertical* de modo que esta sea ortogonal a la dirección del movimiento: el *primer vertical* sigue generando una secuencia de movimiento aparente vertical pero la configuración espacial de los parches gabor es horizontal.

Tres sujetos realizaron el experimento 2, los resultados se muestran en forma de gráficos en la figura 6. Se aprecian por separado los resultados de cada sujeto, la línea punteada es el resultado de cada experimento (de 200 ensayos cada uno), la línea gruesa es el promedio de todos los experimentos del sujeto.

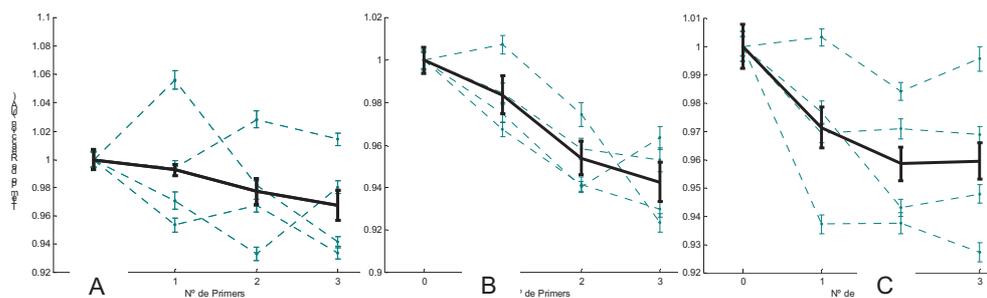


Figura 7. Gráficos de los resultados del experimento 2. Variación del TR (en UA) en función de la composición del *primer vertical* (0, 1, 2 o 3 parches gabor). Las líneas punteadas representan el promedio de los 200 ensayos que componen cada experimento, las líneas gruesas continuas son el promedio de todos los experimentos realizados por cada sujeto.

Se evidencia nuevamente la variabilidad inter-sujeto y la estabilidad entre los gráficos A, B y C) y la variabilidad intra-sujeto (diferencias entre las líneas punteadas dentro del mismo gráfico).

En una primera mirada los resultados del experimento 2 pueden resultar similares a los del experimento 1 y en algunos aspectos lo son: Otra vez observamos variaciones en el TR que depende de la presencia y del número de parches que componen el *primer vertical*. Pero si observamos los valores con detenimiento notamos diferencias significativas en los TR de uno y otro experimento, mientras que en el 1 encontramos variaciones de hasta 14 UA, en el experimento 2 apenas alcanzan la mitad.

Los experimentos 1 y 2 son muy similares, la única diferencia reside en la configuración espacial del *primer vertical*. Mientras que en el primero la orientación de los parches gabor que componen el *primer* está iso-orientada con la dirección del movimiento aparente (vertical), en el segundo estos parches están orientados ortogonales a dicha dirección (horizontal). A fin de lograr una comparación entre los resultados de estos experimentos presentamos los resultados gráficos yuxtapuestos.

En la figura 7 se representan los tiempos de reacción normalizados de las cuatro situaciones del experimento 1 (color rojo), superpuestas con las cuatro situaciones análogas del experimento 2 (color negro).

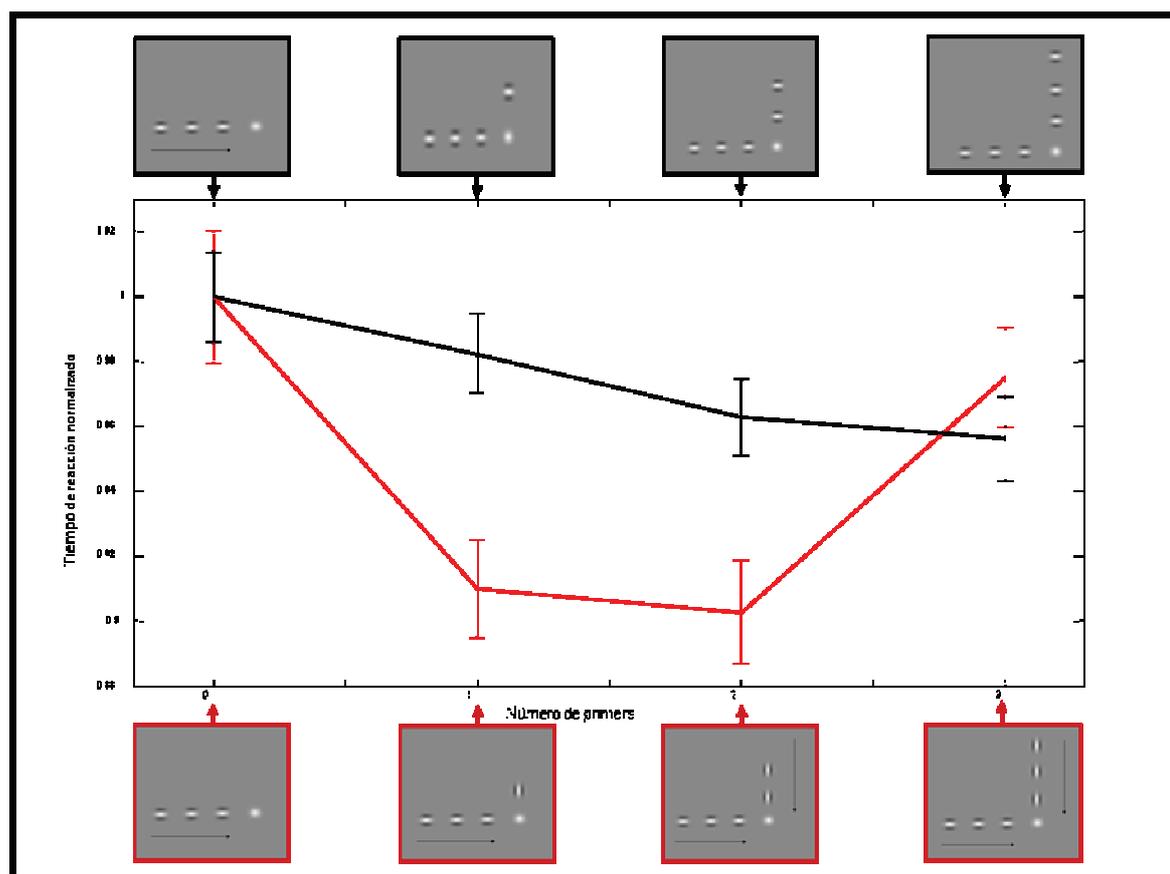


Figura 7. Comparación de los resultados de los experimentos 1 y 2. Variación del TR (en UA) en función de la composición del *primer vertical* (0, 1, 2 o 3 parches gabor). La línea roja representa la media para las 4 situaciones del experimento 1, donde el parche gabor está iso-orientado a la dirección del movimiento aparente del *primer*. La línea negra representa las cuatro situaciones análogas del experimento 2, donde la orientación del parche gabor es ortogonal a la dirección del movimiento aparente del *primer*.

A fin de confirmar estadísticamente las diferencias que se observan entre ambas curvas, específicamente para los casos donde actúan uno y dos *primers*, se realizó el test de Wilcoxon para muestras apareadas. Este indicó una probabilidad de 0.0089 para el caso de un *primer* y 0.0886 para dos *primers* de que las distribuciones no difieran estadísticamente. Esto pone de manifiesto las diferencias ostensibles de los efectos de la orientación del *primer*.

Los datos así presentados revelan una disminución en el TR en presencia del *primer vertical* y una cierta concordancia con el número de parches que componen el *primer* (el TR disminuye a medida que el número de parches aumenta). Esta disminución en la latencia de respuesta se acentúa en el experimento 1 cuando el *primer* está iso-orientado a la dirección del movimiento

aparente; sin embargo, el TR vuelve a aumentar cuando el *primer vertical* se compone de 3 parches gabor; para este caso el *primer vertical* se inicia 144 ms antes de la presentación del estímulo.

Dadas las diferencias encontradas en función del número de parches que componen el *primer vertical*, analizamos la influencia que podría tener por separado cada uno de esos parches. En el experimento 3 exploramos sistemáticamente la variación en el TR en función del tiempo y la distancia que hay entre el estímulo y el *primer vertical simple* (compuesto por un solo parche).

En la figura 8 se representan, manteniendo el esquema de la figura 4, los TR de 6480 ensayos de las nueve situaciones experimentales. Los TR no están expresados en valores numéricos sino mediante un código de colores cuya relación de correspondencia se muestra en la barra vertical de la derecha de la figura, cada color corresponde a un TR normalizado.

El eje de las ordenadas muestra el tiempo que hay entre la aparición del estímulo y el *primer vertical simple*, de esta manera, un tiempo de 144 ms representa que el *primer* se despliega en el tiempo t_1 (condiciones **a**, **b** y **c** de la figura 4), un tiempo de 96 ms indica que se despliega en el tiempo t_2 (condiciones **d**, **e** y **f**) y un tiempo de 48 ms que se despliega en el tiempo t_3 (condiciones **g**, **h** e **i**).

En el eje de las abscisas se indica la distancia en grados de ángulo visual entre la posición del *primer* y el estímulo. Cada columna se corresponde con una distancia (representado esquemáticamente en la parte superior de la figura 8).

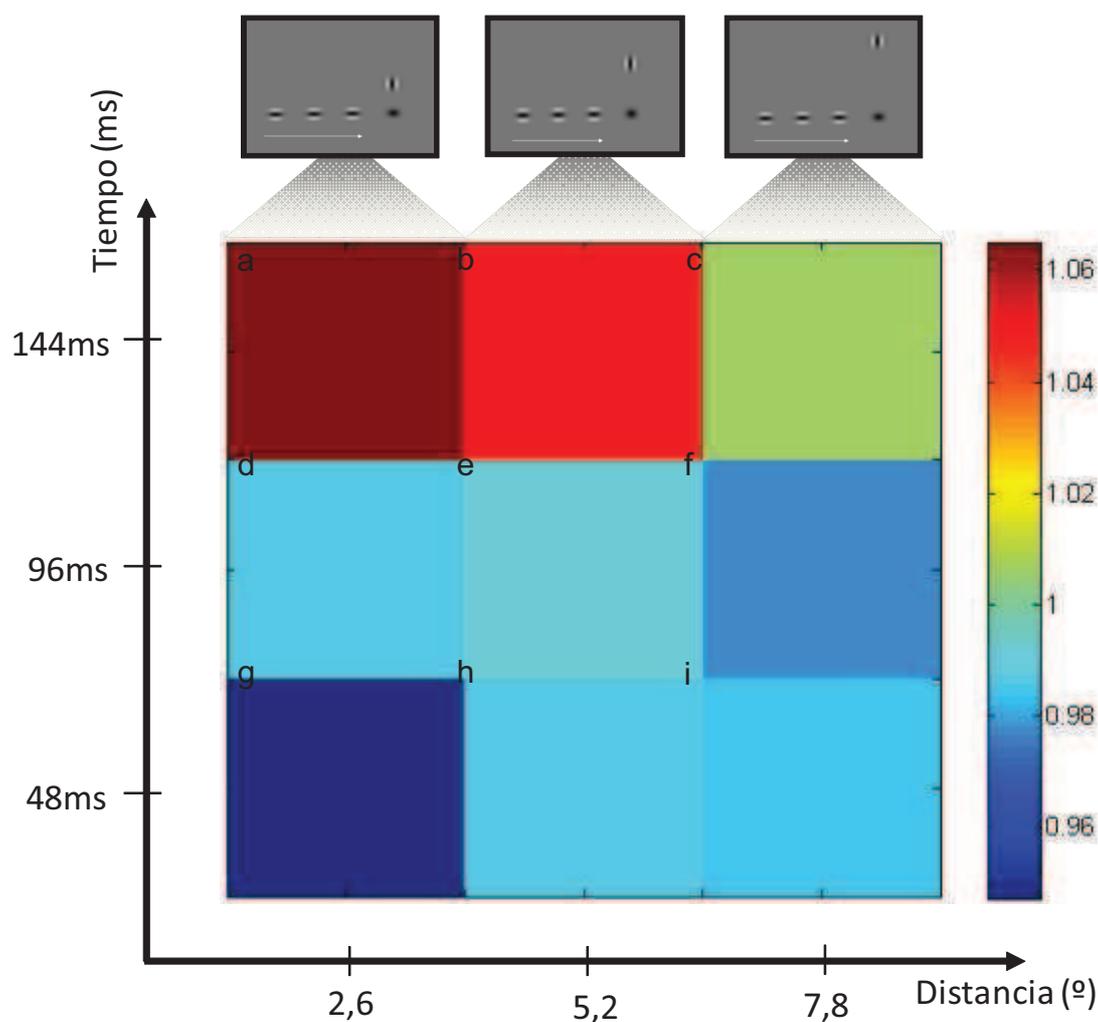


Figura 8. Esquema que representa los TR normalizados del experimento 3. Se muestran los resultados para las 9 situaciones experimentales donde las filas representan el lapso (en ms.) entre el inicio de la presentación del primer y el estímulo, y las columnas la posición del primer (en grados de ángulo visual). El TR normalizado se expresa con un código de colores en UA (relación de correspondencia en la barra vertical de la derecha).

Estos datos muestran la menor latencia de respuesta en la condición experimental **g** y la mayor en la condición **a**, con una gama de tiempos intermedios para el resto de las condiciones. Se observa un aumento en la latencia de respuesta en las condiciones en que el *primer* se encuentra temporalmente alejado del estímulo (condiciones **a**, **b** y **c**). Una apreciación significativa es el hecho de que para las condiciones **a**, **b** y **c** el TR está por encima del valor de referencia, es decir del tiempo de respuesta a un estímulo sin perturbaciones que se obtuvo como la media del TR a un estímulo limpio, libre de *primers verticales*.

7. DISCUSION

Se han presentado los resultados de experimentos psicofísicos que muestran que elementos orientados presentados en posiciones cercanas al estímulo blanco pueden modificar el TR en respuesta a un estímulo. Dado que el componente motor del TR puede considerarse como estadísticamente constante y los experimentos no contienen factores que impliquen decisión, asumimos que las diferencias encontradas se atribuyen al componente perceptual.

Estos resultados indican una fuerte dependencia entre las variables utilizadas en los experimentos (orientación, posición espaciotemporal y dinámica del *primer*) y el tiempo de respuesta del observador. Esto plantea dos terrenos de análisis: por un lado la existencia de elementos facilitadores e inhibitorios que pudieran estar afectando el TR de los observadores. Por otra parte proporciona un plano de observación como para discutir posibles factores atencionales que estén influyendo en el TR.

Con respecto a los factores atencionales, no es nuestro propósito intentar determinar el alcance de los mismos, pero no debemos dejarlos de lado en nuestra perspectiva de análisis. Al diseñar los experimentos se incorporó un *primer horizontal* mediante el cual se busca uniformizar la atención del sujeto, el objetivo de este es minimizar el efecto atencional del *primer vertical*, pero de ningún modo este hecho nos permite asegurar su anulación total. Cuando comparamos los experimentos 1 y 2 vamos todavía más lejos, al efecto del *primer horizontal* sumamos el hecho que los experimentos son casi idénticos, la única diferencia es la orientación de los parches gabor del *primer vertical*. Aun considerando que es difícil descartar todo factor atencional al comparar ambos experimentos y siendo ellos tan similares, ¿es posible que este factor sea el responsable de la ganancia de latencia de la curva del experimento 2?, ¿puede este efecto atencional explicar la diferencia entre la curva roja del experimento 1 (donde el *primer* esta iso-orientado a la dirección del movimiento) y la curva negra del experimento 2 (donde la orientación del *primer* es ortogonal a la dirección del movimiento)? Creemos que en este caso el factor atencional no parece tener la fuerza como para explicar estas diferencias pero en todo caso no debe escapar a nuestro análisis. Asimismo, en el experimento 3 no parece razonable que las diferentes distancias *primer-estímulo* que hay en las

9 situaciones experimentales pueda ocasionar por si sola una variación sistemática en la atención capaz de explicar las diferencias en los TR obtenidos.

¿Sería posible entonces aislar el efecto atencional? Creemos que no, pero al menos no hay motivo para pensar que puede afectar en forma diferente en una y otra situación experimental, dado que, para que así fuera, deberíamos considerar la existencia de diferencias a nivel de mecanismos en la atención capaces de explicar cada una de las situaciones experimentales planteadas.

Orientamos entonces nuestro análisis hacia los *primers* como elementos facilitadores e inhibitorios. Centrándonos nuevamente en el experimento 1, inferimos que la disminución en el TR observada en las situaciones experimentales **b** y **c** es atribuible a una disminución de la latencia en la percepción del estímulo y este es percibido más rápidamente. El siguiente esquema ilustra este fenómeno:

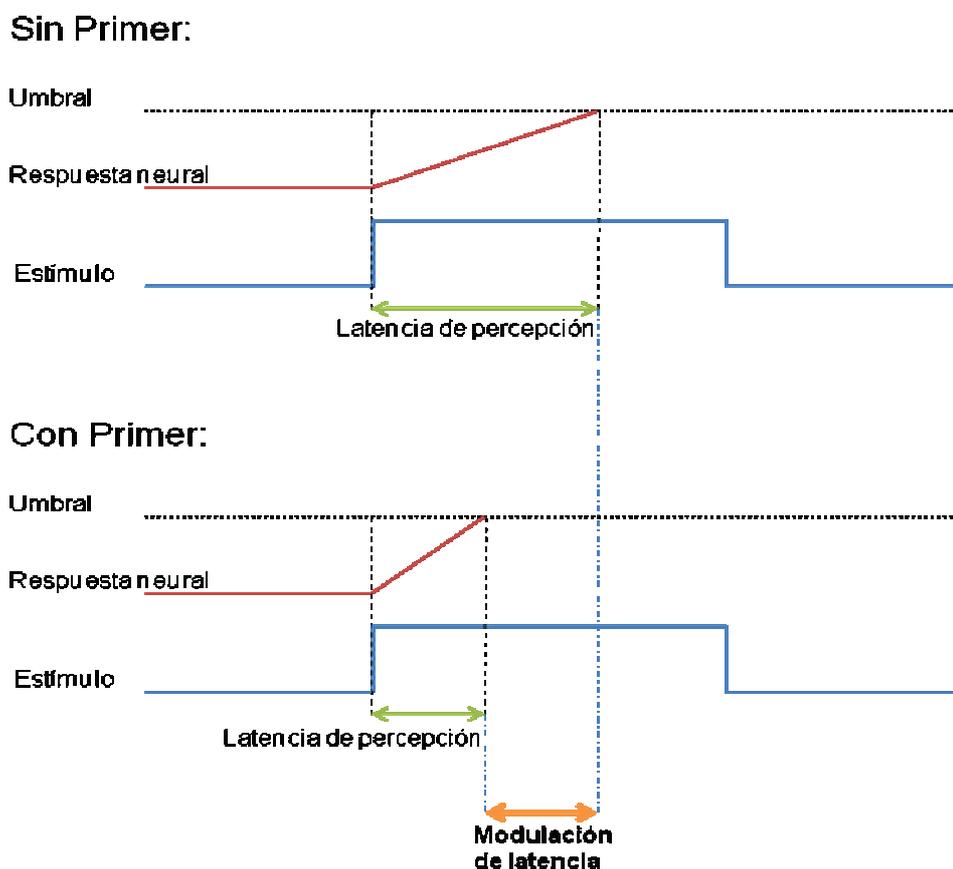


Figura 9. Esquema de modulación de la latencia de percepción del estímulo. Arriba: El estímulo no está precedido por *primers* (situación **a** del experimento 1). La latencia de percepción está dada por el tiempo entre la presentación del estímulo y la respuesta de la neurona (flechas verdes). Abajo: El estímulo está precedido por el *primer* y este produce una pre-activación capaz de acortar la latencia de percepción. La modulación de la latencia está representada por las flechas naranjas (situaciones experimentales **b** y **c**).

En las situaciones experimentales **b** y **c** se observa un acortamiento de la latencia de percepción presumiblemente producida por el *primer*, este originaría un efecto de pre-activación de la neurona blanco resultando en una modulación de la latencia, inexistente en la situación **a** (que no tiene *primer*). Pero ¿Qué es lo que sucede entonces con la situación experimental **d**?, en esta la modulación de latencia es notoriamente menor y sin embargo está precedida por un *primer*. ¿cómo se podría explicar este resultado?. Quizás la explicación no esté en una disminución en la pre-activación sino en mecanismos de inhibición intrínsecos. Volveremos sobre este punto durante el análisis del experimento 3.

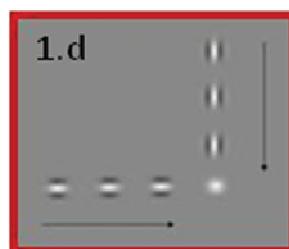
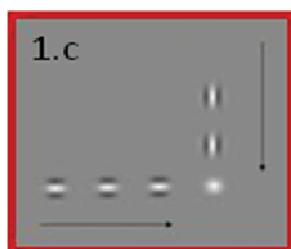
Los resultados del experimento 2 no se asemejan a los del experimento 1 en el sentido que no es apreciable que exista una evidente modulación de latencia. Siendo que la única diferencia que existe entre ambos experimentos es la orientación de los parches gabor que componen el *primer*, los resultados indican una fuerte dependencia entre la orientación del *primer* y el tiempo de respuesta del observador. Series y colaboradores encontraron que esta modulación de latencia perceptual es muy sensible a la isotropía de orientación, y depende del ángulo entre la orientación del elemento y el eje de del movimiento. A medida que el ángulo aumenta, la facilitación disminuye gradualmente (Series et al., 2002). Esto sugiere que están implicadas unidades altamente sensibles a la orientación, una propiedad fundamentalmente expresada por neuronas de la corteza visual primaria (es poco probable que la retina o el LGN participen, debido a que no son células “orientación-selectivas”).

El experimento 3 arroja datos valiosos para un estudio espacial y temporal. Si analizamos la figura 8 por filas, estamos comparando diferentes configuraciones espaciales pero en el mismo instante temporal. Así por ejemplo en la fila inferior, que corresponde a un *primer* que se inicia 48 ms. antes de la presentación del estímulo (situaciones experimentales **g**, **h** e **i**), observamos que cuando el *primer* aparece en la posición espacial más cercana al centro del campo receptivo (situación **g**) es cuando se produce mayor facilitación, no sólo comparada con **h** e **i** sino con todas las situaciones estudiadas.

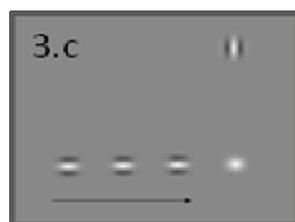
Curiosamente, cuando el *primer* se halla temporalmente más alejado (144 ms., situaciones **a**, **b** y **c**) la menor latencia de respuesta no es la producida por el *primer* espacialmente más cercano sino por el más lejano. Pero hay algo más, en esta fila todas las latencias son mayores que el valor de referencia (que representa el TR al estímulo limpio, sin *primers*). Es decir que no sólo no hay facilitación sino que además estaríamos en presencia de algún tipo de inhibición. Si aceptamos que estos *primers* presentados 144ms. antes del estímulo producen inhibición, entonces no resulta extraño que el más alejado espacialmente sea el que arroje menor latencia de respuesta, dado que este sería el que provoca menor efecto, en este caso, menor inhibición.

Si reflexionamos sobre los resultados obtenidos en el experimento 1 situación **d** y el experimento 3 situación **c**, encontramos que ambos escenarios pueden ser comparables (ver figura 10): como se destacó anteriormente, en estas situaciones el *primer* se inicia 144 ms. antes de la presentación del estímulo; la diferencia radica en que el *primer* del experimento 1 consta de 3 parches (contra uno del tercer experimento), dicho de otra forma, al experimento 3 le faltan los parches de los instantes t_2 y t_3 del experimento 1.

Nos preguntamos si el parche correspondiente a t_1 está generando algún tipo de onda inhibitoria en paralelo. En el experimento 1, la situación **c** produce claramente facilitación pero en la situación **d** esta facilitación es mucho menor:



Y en el experimento 3 la situación **c** produce inhibición:



¿Podríamos interpretar que

$$1.d = 1.c + 3.c?$$

Figura 10. Esquema de comparación entre distintas situaciones de los experimentos 1 y 3.

Estas relaciones pueden no tener la linealidad con que se expresan, pero entendemos que el concepto que encierra puede ser procedente; de ser así la disminución de la facilitación de **1.d** podría ser la resultante de la facilitación producida por el *primer* ilustrado en **1.c** y la inhibición del *primer* ilustrado en **3.c**. Es decir el resultado de dos ondas que compiten: una facilitadora y otra inhibitoria. Mientras el *primer* de la situación **1.c** está generando una onda de facilitación, esta compite con una onda de inhibición en paralelo originada por el *primer* señalado en **3.c**. Nos preguntamos entonces ¿es el elemento del *primer* que aparece en **3.c** el responsable de la inhibición? De ser así ¿es su condición espacial o su condición temporal la que tiene la potencialidad de generar este efecto inhibitorio? ¿podrían ser ambas?

Resulta claro que en el experimento 1 podemos apreciar un efecto de facilitación cuando los *primers* están presentes. Esta onda de facilitación aparece cuando el *primer* se compone de un solo parche gabor y también cuando se compone de dos parches. Si el *primer* se compone de tres parches conformando un movimiento aparente hacia el objetivo, la facilitación se hace menos evidente, probablemente debido a una onda de inhibición que se acumula en paralelo.

Retomando el análisis del experimento 3, si observamos la figura 8 centrándonos en las columnas estamos comparando una misma configuración espacial en diferentes instantes. En la columna de la izquierda es notorio que cuanto más alejado temporalmente está el *primer* del estímulo, mayor es la latencia de respuesta (menor es la facilitación). En las dos columnas restantes esta situación tiende a mantenerse aunque aparece algún conflicto en los resultados correspondientes a 48 y 96 ms. Nos preguntamos entonces ¿qué mecanismos pueden dar cuenta de estos resultados?, ¿cuál es el sustrato neuronal que está detrás de esta pre-activación?

Comenzamos nuestro análisis enfocándonos en las conexiones horizontales y su velocidad de conducción.

Georges y colaboradores encuentran un efecto máximo de facilitación con velocidades entre 50-75 °/s haciendo un pico a 64 °/s (Georges et al., 2002). Chavanne y colaboradores concuerdan en que la velocidad óptima es cercana a los 64 °/s, que corresponde a una velocidad de conducción de 0,2 m/s en las conexiones horizontales (Chavanne et al., 2000).

Pese a que en el experimento 3 el *primer vertical* está compuesto por un solo parche gabor y por si solo no sería capaz de generar un movimiento aparente, el hecho de que el estímulo se despliegue unos pocos ms. más tarde y en una posición cercana, es suficiente para crear la ilusión de un movimiento aparente. Esto nos permite establecer una posible correlación con la propagación de la señal a través de las conexiones horizontales, llamaremos velocidad supuesta del *primer* al cociente entre la distancia del *primer* al estímulo y el tiempo que transcurre desde que se enciende el *primer* hasta que se enciende el estímulo.

La columna de la izquierda de la figura 8 resulta interesante de analizar porque los efectos del *primer* parecen estar expresándose más sólidamente. Esta columna corresponde a las condiciones donde el *primer* se presenta espacialmente cercano al estímulo, es notorio que en esta condición se magnifica el efecto del *primer*, sea este facilitador o inhibitorio. Calculamos entonces la velocidad supuesta del *primer* en las situaciones **a**, **d** y **g**:

Situación **a** : $2.6^\circ / 0.144s = 18.06 \text{ }^\circ/s$
 d : $2.6^\circ / 0.096s = 27.08 \text{ }^\circ/s$
 g : $2.6^\circ / 0.048s = 54.17 \text{ }^\circ/s$

Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por los equipos de Georges y de Chavane, vemos que existe cierta concordancia: Para la situación experimental **g**, en la que el *primer* se presenta temporalmente cercano al estímulo, obtenemos la mayor facilitación, en esta situación la velocidad es cercana a la estimada como óptima por los mencionados investigadores.

En la situación **d** la facilitación es menor, es posible que si la velocidad supuesta del *primer* es demasiado baja, la señal facilitadora llegue demasiado temprano y el efecto de pre-activación haya comenzado a perderse. En la situación **a** la velocidad supuesta es todavía menor, y no obtenemos facilitación sino inhibición. Una posible explicación de este resultado es que podría estar desarrollándose una onda inhibitoria en paralelo que sigue a la onda facilitadora.

Veamos un esquema que incluya las velocidades supuestas del *primer*. Este esquema no sólo nos permite realizar comparaciones a tiempos fijos (filas) y distancias fijas (columnas) sino también comparar qué sucede a una velocidad fija de 54.17 %s en la diagonal (situaciones **g**, **e** y **c**) mientras varían las condiciones espaciales y temporales (figura 11).

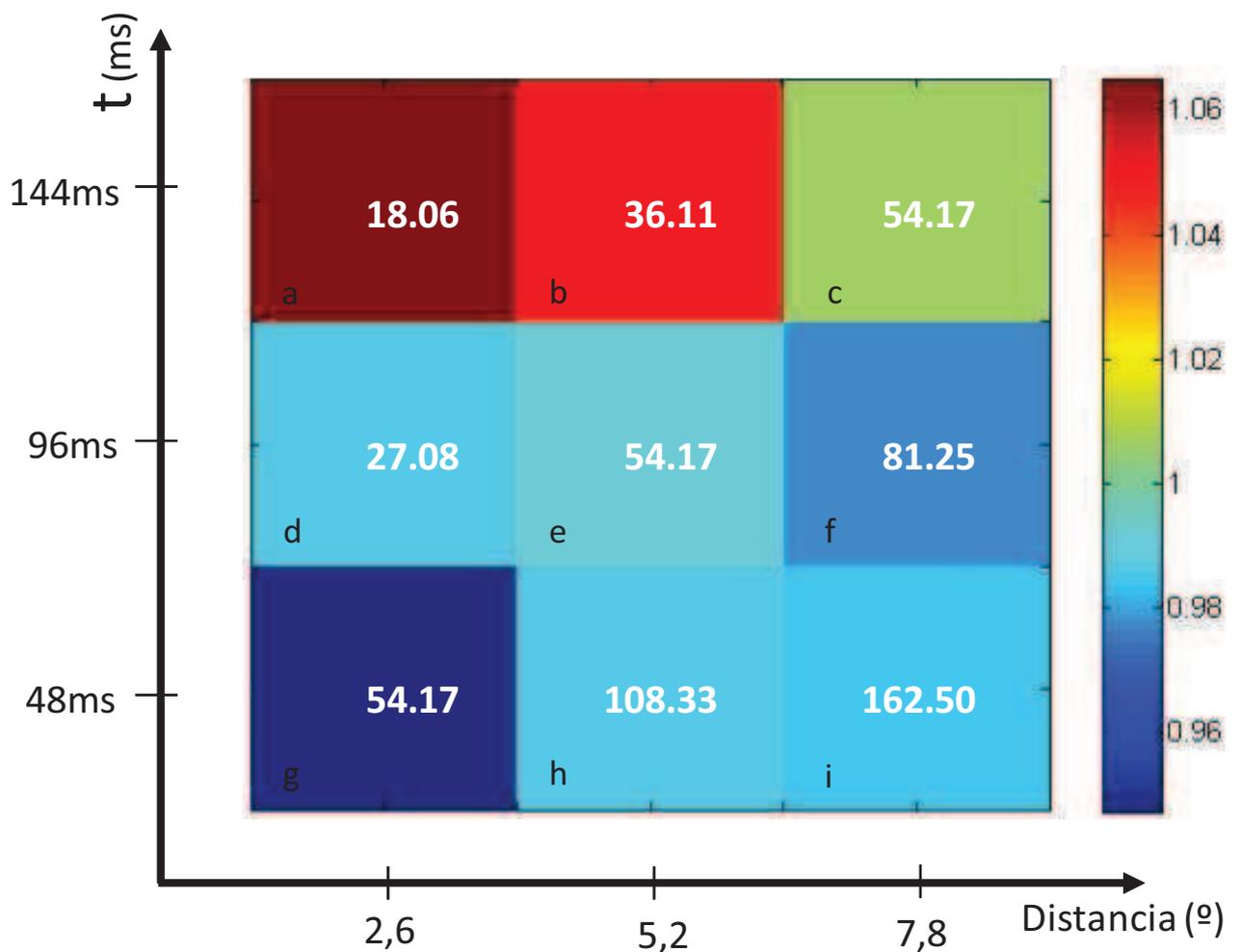


Figura 11. Esquema que representa los TR normalizados del experimento 3 a los que se han agregado la *velocidad supuesta del primer* calculada como el cociente de la distancia del *primer* al estímulo y el tiempo que transcurre desde que se enciende el *primer* hasta que se enciende el estímulo.

Estos resultados muestran que aun manteniendo fija la velocidad supuesta del *primer* la facilitación no se mantiene constante, ésta varía con las condiciones espacio-temporales, haciendo que los TR sean menores cuanto más cerca del estímulo esté el *primer* (espacial y temporalmente), aunque la velocidad supuesta del *primer* sea la misma.

En la fila superior, donde el *primer* se presenta mucho antes que el estímulo, nunca obtuvimos facilitación, parece ser que con una distancia temporal tan lejana (144 ms.) sólo obtenemos inhibición. Sin embargo a la mayor distancia con la que hemos trabajado (7.8°) se obtuvo una facilitación importante en la situación *f*, que luego de la situación *a*, es la que presenta mayor facilitación. La velocidad supuesta del *primer* en este caso es de 81.25 °/s, una velocidad no muy alejada de la señalada como óptima en las mencionadas investigaciones previas.

Series et al., 2002 proponen el siguiente modelo de pre-activación:

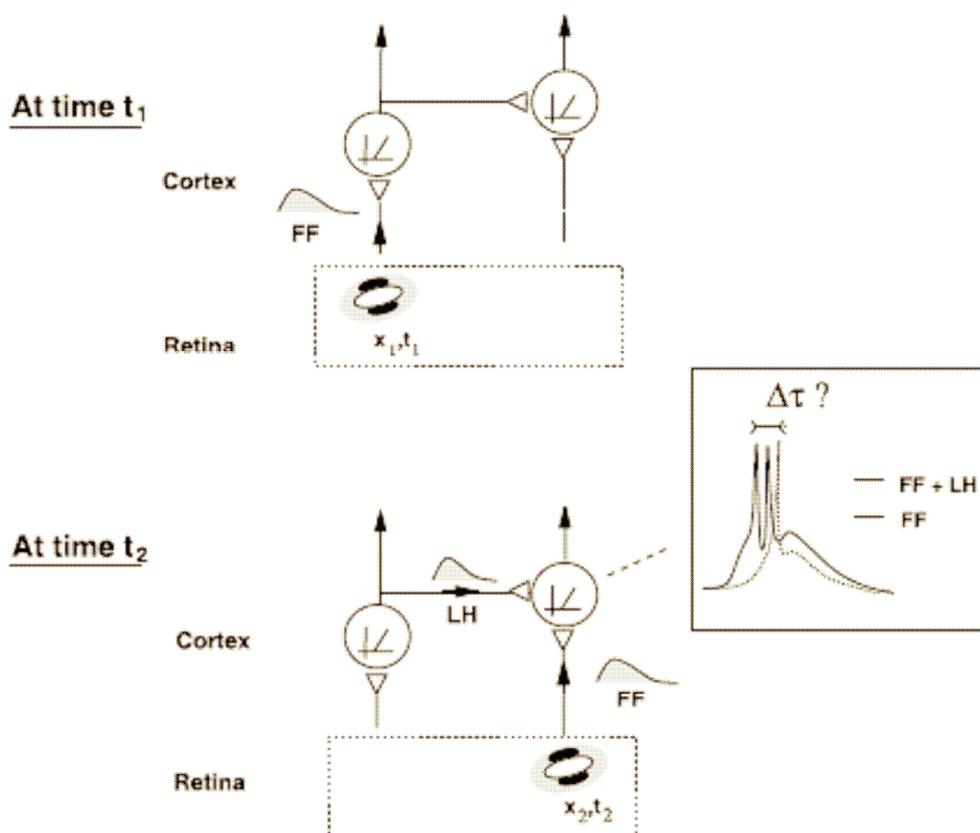


Figura 12. Modelo de facilitación propuesto Series et al., 2002 mediado por conexiones horizontales (LH) que ejercen una pre-activación sobre la neurona blanco haciendo que se acorte latencia de respuesta de a la señal FF (conexión vertical) que proviene desde la retina.

En este modelo N células de V1 pertenecientes a distintas hipercolumnas (misma preferencia de orientación y campos receptivos que no se superponen) interactúan a través de conexiones horizontales (conexiones LH) de lenta velocidad de propagación. Cuando una célula cruza el umbral emite una señal LH que alcanza el soma de la neurona blanco pos-sináptica, luego de una demora igual al cociente

de la distancia viajada con la velocidad de la propagación LH. Esta señal llega a la neurona blanco efectuando una pre-activación que acorta la latencia de respuesta a la señal FF (conexiones verticales) proveniente desde la retina. (Adaptado de Series et al., 2002)

Este modelo tiene la potencialidad de explicar las facilitaciones encontradas pero no así las inhibiciones que se evidencian en la fila superior de la figura 8. Hemos encontrado efectos inhibitorios cuando las señales son previas a la ventana espacio-temporal que causa facilitación. Este comportamiento podríamos representarlo como se muestra en la figura 13, donde la señal facilitadora es seguida por una inhibitoria. Además las señales son más eficientes (tienen mayor potencial facilitador o inhibitorio) cuanto menor es la distancia que las separa del estímulo.

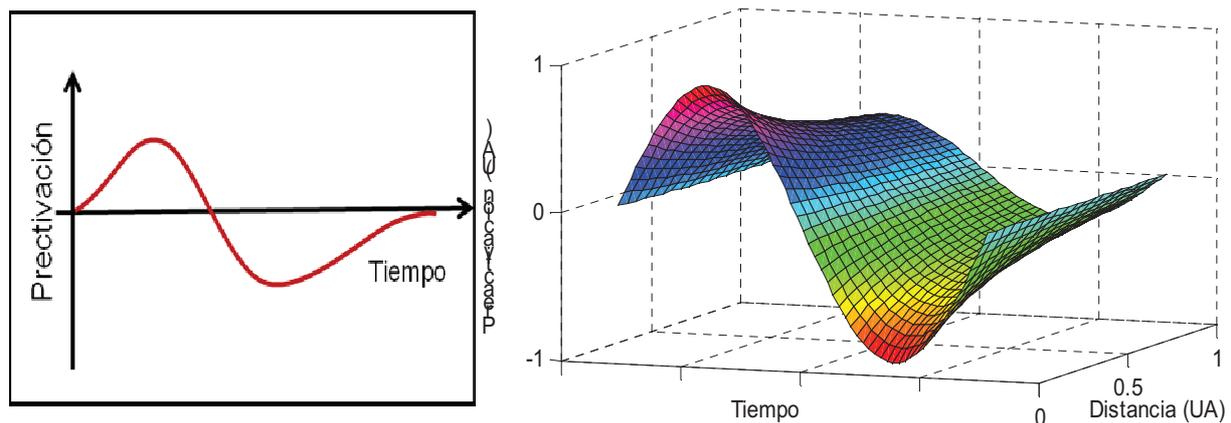


Figura 13. Izquierda: Esquema representativo de la pre-activación que produce la señal facilitadora/inhibitoria sobre la neurona blanco en función del tiempo. La onda facilitadora es seguida por una onda inhibitoria. Derecha: El mismo esquema en el que se representa también la variable distancia. La magnitud de la facilitación/inhibición decrece con la distancia.

Así, una señal de origen cercano tendrá un efecto mayor, sea este facilitador o inhibitorio, que una señal que proviene de una neurona más alejada.

8. CONCLUSIONES

Hemos presentado experimentos psicofísicos que confirman que el tiempo de reacción a un objetivo que aparece en el centro del campo receptivo, puede ser influenciado por la presencia de un estímulo previo (*primer*) que se dirige en movimiento aparente hacia el objetivo.

Este *primer* modifica el tiempo de reacción al estímulo blanco, presumiblemente realizando una pre-activación desde áreas vecinas. Esta modificaría la latencia de percepción causando una variación apreciable en el tiempo de reacción.

La modificación de la latencia de percepción es sensible a la orientación del *primer*, haciéndose más fuerte cuando está iso-orientado al eje del movimiento y disminuyendo drásticamente cuando es ortogonal a él. Esta modulación de la latencia puede obtenerse no sólo con un *primer* que se desplaza en movimiento aparente hacia el objetivo sino también con un *primer* inmóvil que se presenta cercano a la posición del objetivo.

Los *primers* que provocaron mayores facilitaciones tienen un desplazamiento aparente alineado con las velocidades de propagación en las conexiones horizontales descritas en investigaciones previas, y los resultados obtenidos son consistentes con la dinámica de la corteza visual primaria y la participación de las conexiones horizontales.

En este trabajo hemos encontrado que el *primer* puede modular esta latencia de percepción reduciéndola pero también dilatándola, actuando como elemento facilitador o inhibidor, dependiendo de la ventana espacio-temporal respecto del estímulo blanco. Los *primers* que han provocado mayor efecto, sea este facilitador o inhibitorio son los que se presentan espacialmente cercanos al objetivo. Cuando estos se presentan temporalmente cercanos su efecto es notoriamente facilitador, en cambio, cuando se presentan temporalmente alejados del objetivo su efecto es inhibitorio.

Nuestros resultados confirman la existencia de una onda de facilitación que podría tener un rol en la percepción del movimiento. Esta facilitación tiene su efecto máximo en una determinada ventana temporal y espacial. También muestran que

esta onda de facilitación es seguida por un efecto de inhibición. Proponemos que una onda de inhibición en paralelo originada por los mismos *primers* es la que provoca una dilatación de la latencia de percepción.

En Resumen, podemos apreciar claramente una disminución en el TR cuando los *primers* están presentes, esta disminución sería ocasionada por una modulación de la latencia de percepción. Una onda de facilitación proveniente desde áreas vecinas, que causa una pre-activación sobre la neurona blanco, podría ser el mecanismo que explica esta modulación de latencia. Esta onda de facilitación es seguida por una onda de inhibición que se acumula en paralelo.

Las conexiones horizontales de largo alcance en V1 podrían dar el sustrato neural para este mecanismo. Proponemos que las interacciones dinámicas en V1, entre las señales que se propagan a través de las conexiones horizontales y verticales pueden dar cuenta de las modulaciones en la latencia de respuesta encontradas en nuestros experimentos, y explicar su relación con la configuración espaciotemporal de los estímulos previos.

9. AGRADECIMIENTOS

A la UDELAR por haberme dado esta posibilidad, a la Facultad de Ciencias, a toda la Sección de Biomatemática y especialmente al Laboratorio de Neurociencias por abrirme las puertas, por haberme integrado a sus investigaciones y recibirme y apoyarme siempre. A todos los docentes de la facultad de ciencias que me apoyaron en este proceso, especialmente a Ruben, Leonel y Alejandro por su estímulo, su tiempo y su paciencia que no siempre supe devolver.

A Nati, Domi y Lu, compañeras de viaje que me facilitaban las cosas cuando no era posible concurrir a los teóricos o el tiempo no alcanzaba para preparar un examen o un parcial.

A Marcela Piffaretti que me transmitió su formidable sentido del esfuerzo y compañerismo.

A mi esposa Inés y mis hijas Isabella y Martina por su amor y apoyo incondicional.

10.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baudot P., Chavane F., Pananceau M., Edet V., Gutkin B., Lorenceau J., Grant K., & Fregnac Y. (2000). Cellular correlates of apparent motion in the association field of cat area 17 neurons. Society for Neuroscience Abstracts; 162.2

Blasdel G.G. (1992a). Differential imaging of ocular dominance and orientation selectivity in monkey striate cortex. The Journal of Neuroscience; 12(8):3115-38.

Blasdel G.G. (1992b). Orientación selectivity, preference and continuity in monkey striate cortex. The Journal of Neuroscience; 12(8):3139-61.

Bonnet C. (1994). Psicofísica de los tiempos de reacción: Teorías y métodos. Revista Latinoamericana de Psicología; 26:431-444.

Bonnet C. y Dresch B. (2001). Investigations of sensory magnitude and perceptual processing with reaction times. Psychologica; 28:63-86.

Bonnet C. y Link S. (1998) Analyzing individual differences in Reaction Times. En S. Gondrin y Y. Lacouture (Eds.), Fechner Day 98; ISP Québec 161-166.

Binguier V., Chavane F., Glaeser L., & Fregnac Y. (1999). Horizontal propagation of visual activity revealed in the synaptic integration field of area 17 neurons. Science; 283(5402): 695–699.

Calvin W.H. (1994). The Emergence of Intelligence. Scientific American; 271(4):100-7

Cass J. y Alais D. (2006). The mechanisms of collinear integration. Journal of Vision; 11,6(9):915-22.

Cattell J. M. (1902). The time of perception as a measure of differences in intensity. Philosophische Studien; 19: 63-68.

Chavane F., Monier C., Bringuier V., Baudot P., Borg-Graham L., Lorenceau J., & Frégnac Y. (2000). The visual cortical association field: a gestalt concept or a psychophysical entity? Journal of Physiology; 94(5-6):333-342.

Chocholle R. (1972). Los Tiempos de Reacción. Sensación y Motricidad; Paul Fraisse y Jean Piaget comp. Buenos Aires. Editorial Paidós; 77-152.

Dror R. O., O'Carroll D. C. y Laughlin S. B. (2001). Accuracy of velocity estimation by Reichardt correlators. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis; 18(2):241-252.

Forbes G. (1945). The effect of certain variables on visual and auditory reaction time. Journal of Experimental Psychology; 35:153 –162.

Georges S., Seriès P., Frégnac Y. & Lorenceau J., (2002) Orientation dependent modulation of apparent speed: psychophysical pvidende. Vision Research; 42(25):2757–2772

Gilbert C.D. y Wiesel T.N. (1989). Columnar specificity of intrinsic horizontal and corticocortical connections in cat visual cortex. The Journal of Neurosciece; 9(7):2432-42.

Green D. M. y Swets J. A. (1966). Signal Detection Theory and Psychophysics; New York: Wiley.

Hikosaka O., Miyauchi S., & Shimojo S. (1993). Focal visual attention produces illusory temporal order and motion sensation. Vision Research; 33, 1219–1240.

Hochberg J.E. (1978). Perception; Englewoods Cliffs, N.J.: Prentice-Hall.

Hubel D.H., Wiesel T.N. (1959). Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. The Journal of Physiology; 148:574-91.

Hubel D.H., Wiesel T.N. (1962). Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. The Journal of Physiology; 160:106-54.

Hubel D.H., Wiesel T.N. (1979). Brain mechanisms of vision. Scientific American; 241(3):150-62.

Hubel D.H., Wiesel T.N., Stryker M.P. (1977). Orientation columns in macaque monkey visual cortex demonstrated by the 2-deoxyglucose autoradiographic technique. Nature; 22;269(5626):328-30

Hubel DH, Wiesel TN (1968). Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex. The Journal of Physiology; 195(1);215-43.

Hupé J.M., James A.C., Girard P., & Bullier J. (2001). Response modulations by static texture surround in area V1 of the macaque monkey do not depend on feedback connections from V2. Journal of Neurophysiology; 85,146-163.

Jancke D., Chavane F., Naaman S., & Grinvald A. (2004). Imaging cortical correlates of illusion in early visual cortex. Nature; 428(6981), 423–426.

Kandel E.R., Schwartz J.H. y Jessell T.M. (2001). Principios de Neurociencia; Madrid: Mc Graw-Hill.

Kleitman N., Titelbaum S. y Feiveson P. (1935). Diurnal variation in reaction time and its relation to body temperature. American Journal of Physiology; 115:82.

Klemmer E. T. (1956). Time uncertainty in simple reaction time. Journal of Experimental Psychology; 51(3): 179-184.

Maiche A., Budelli R., Gómez-Sena L. (2007). Spatial facilitation is involved in flash-lag effect. Vision Research; 47(12):1655-61.

Mateeff S., Genova B. y Hohnsbein J. (1999). The simple reaction time to changes in direction of visual motion. Experimental Brain Research; 124(3): 391-394.

McGuire B.A., Gilbert C.D., Rivlin P.K., Wiesel T.N. (1991). Targets of horizontal connection in macaque primary visual cortex. The Journal of comparative neurology; 15;305(3):370-92.

Miller J. O. & Low K. (2001). Motor processes in simple, go/no-go, and choice reaction time tasks: a psychophysiological analysis. Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance; 27: 266.

Owen W. A. (1959). Effects of motivating instructions on reaction time in grade school children. Child Development; 30(2):261–267.

Pelli D. G. (1997). The VideoToolbox software for visual psychophysics: Transforming numbers into movies. Spatial Vision; 10(4), 437–442.

Pins D. y Bonnet C. (1996). On the relation between stimulus intensity and processing time: Piéron's law and choice reaction time. Perception and Psychophysics; 58:390-400.

Pins D., Bonnet C. (1997). Reaction times reveal the contribution of the different receptors components in luminance perception. Psychonomic Bulletin & Review; 4:359-366

Seriès P., Georges S., Lorenceau J., & Frégnac Y.(2002) Orientation dependent modulation of apparent speed: a model based on the dynamics of feedforward and horizontal connectivity in V1 cortex. Vision Research; 42(25):2781–2797

Steinman B. A., Steinman S. B., & Lehmkuhle S. (1995). Visual attention mechanisms show a center-surround organization. Vision Research; 35, 1859–1869.

Tynan P. D. y Sekuler R. (1982). Motion processing in peripheral vision: Reaction time and perceived velocity. Vision Research; 22(1): 61-68.

Washburn M. F., Keller K., New K. B. y Parshall F. M. (1929). Experiments on the relation of reaction-time, cube fluctuations and mirror drawings to temperamental differences. American Journal of Psychology; 41: 112-117.

Wundt W. (1903). Naturwissenschaft und Psychologie. Grundzüge physiol. Psychol., Schlussbetrachtungen; Leipzig: Engelmann.

Zeki S., Watson J.D., Lueck C.J., Friston K.J., Kennard C., Frackowiak R.S.(1991). A direct demonstration of functional specialization in human visual cortex. Journal of Neuroscience; 11(3):641-9.

Selectividad y permeabilidad de la Na/K ATPasa

-Influjo desacoplado de cationes-

Camila Zugarramurdi

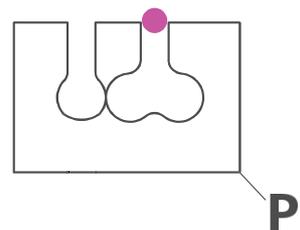
Licenciatura en Biología Humana

Universidad de la República

Tutores:

Pablo Artigas PhD – Cell Physiology and Molecular Biophysics Texas Tech University Health Sciences Center

Dr. Leonel Gómez-Sena – Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias Universidad de la República



Montevideo, Agosto 2010

Habría que decir, por ejemplo, que siempre fracasamos frente a la realidad, que la teoría, herramienta finita frente a algo de complejidad infinita, será siempre insuficiente y la comprensión que de ella podemos alcanzar inevitablemente tosca e incompleta; pero esto solo vuelve más patente que, para comprenderla mejor, para verla mejor, no hay otro instrumento que lo que llamamos teoría: el uso de nuestra mente animada por la intuición y controlada por la experiencia y el rigor racional.

Eladio Dieste - La invención inevitable

Resumen

La Na/K ATPasa, o bomba de Na⁺, es la ATPasa de tipo P que mantiene los gradientes de concentración de Na⁺ y K⁺ a través de la membrana plasmática en casi todos los tejidos animales. La bomba presenta tres sitios de unión de cationes, uno de los cuales es exclusivo para el ion Na⁺, mientras que a los otros dos pueden unirse tanto Na⁺ como K⁺. Según datos reportados en oocitos de *Xenopus laevis* (Yaragatupalli et al., 2009 y Wang & Horisberger, 1995 respectivamente), en ausencia de Na⁺ y K⁺ del lado extracelular, la bomba es capaz de importar pasivamente guanidinio⁺ o protones. A pesar de la disponibilidad de estructuras cristalinas de alta resolución, el mecanismo de selectividad por iones en cada sitio no se comprende en profundidad.

En este trabajo estudiamos estas corrientes pasivas a través de la NaK ATPasa en miocitos ventriculares, una preparación con alta densidad de bombas de Na⁺. La identificación de dichas corrientes indican que éste es un fenómeno común a todas las NaK ATPasas y no un artefacto de la preparación en oocitos. Además, mediante el uso de bloqueadores del acceso a los sitios comunes, tales como el tetrapropilamonio (TPA) (Gatto et al., 2005), presentamos evidencia de que el acceso de iones a la vía de pasaje de la corriente pasiva es distinto del acceso de iones K⁺ a sus sitios de oclusión.

Introducción

En humanos la Na/K ATPasa presente en el tejido cardíaco es el blanco de acción de esteroides cardiotónicos (entre los que se incluyen la ouabaína y digitalis, entre otros) en el tratamiento de insuficiencia cardíaca y arritmias supraventriculares tal como la fibrilación auricular. La Na/K ATPasa posee un sitio de unión para éstos compuestos y su acción, mediada por el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ del sarcolema, fortalece la contracción muscular y disminuye la frecuencia cardíaca. Existe un campo activo de investigación sobre la regulación de la Na/K ATPasa por esteroides cardiotónicos, sobre la relevancia de sus sitios de unión en la unión de compuestos endógenos así como su función como receptor, modulador del balance de fluidos corporales, y su participación en la regulación de la presión sanguínea.

La bomba de Na⁺ intercambia dos iones de K⁺ del lado extracelular por tres iones de Na⁺ del lado citoplasmático, usando la energía liberada por la hidrólisis de una molécula de ATP. Es también capaz de importar otros iones de pequeño tamaño tales como Ti⁺, Rb⁺, Cs⁺, NH₄⁺ (sustituyendo al K⁺ extracelular) o Li⁺, el cual puede sustituir tanto al K⁺ externo como al Na⁺ interno (Glitsch, 2001).

Esta bomba es una proteína de membrana compuesta por dos subunidades: α, con actividad catalítica; y β, asociada al transporte de la proteína hacia su sitio de inserción final en la membrana

plasmática. En algunos tejidos presenta además una subunidad γ con actividad regulatoria. La bomba alterna entre dos conformaciones según los sitios de unión estén expuestos al lado intracelular (E1) o extracelular (E2) (ver Fig.1). En la conformación E1 la bomba presenta alta afinidad aparente por Na^+ ; en presencia de Na^+ el ATP se une a la bomba y ésta se fosforila, se da entonces el cambio conformacional hacia E2-P. En la conformación E2 (que presenta alta afinidad al K^+) la bomba se abre al lado extracelular liberando el Na^+ . Una vez liberado el Na^+ , la unión extracelular de K^+ acelera la desfosforilación y el cambio conformacional hacia E1 (asociado a la liberación intracelular de K^+), reseteando el ciclo. Los estados intermedios entre ambas conformaciones (esquina superior derecha y esquina inferior izquierda en la Fig. 1) se conocen como estados de oclusión, en que los iones están dentro de la proteína sin exponerse al lado intra o extracelular.

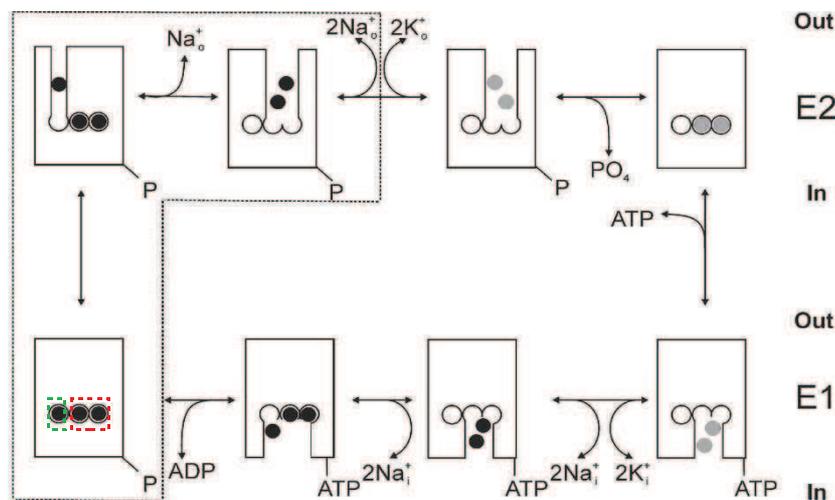


Fig. 1. Diagrama de Albers-Post de la Na/K ATPasa superimpuesto con una representación de la unión y liberación de Na^+ (negro) y K^+ (gris). El recuadro punteado en negro encierra estados asociados a la liberación de Na^+ , en rojo sitios compartidos para Na^+ y K^+ , en verde sitio exclusivo de Na^+ (Modificado de Yaragatupalli *et al.*, 2009).

De los tres sitios de unión iónica en la subunidad α , dos pueden unir tanto Na^+ como K^+ (recuadro rojo en Fig. 1) y uno es exclusivo para Na^+ (recuadro verde en Fig. 1). La liberación de Na^+ se da de forma secuencial (Holmgren *et al.*, 2000), la liberación del primer Na^+ (presumiblemente desde el sitio exclusivo) presenta una mayor dependencia de voltaje y es responsable de la inhibición voltaje dependiente de la corriente en presencia de Na^+ extracelular (Li *et al.*, 2005; Yaragatupalli *et al.*, 2009). Esto ocurre debido a que a potenciales de membrana más negativos (o a concentraciones de Na^+ extracelular menores), el primer Na^+ liberado tiende a volver al canal de acceso del sitio de unión, atraído por el campo eléctrico a través de la membrana. Esto tiene consecuencias para la actividad de la bomba en presencia de Na^+ externo, disminuyendo la tasa de bombeo a potenciales de membrana más negativos respecto a voltajes menos negativos. A voltajes muy negativos (-150 mV o menores), el Na^+ permanece unido al sitio de unión y la bomba no cicla.

En condiciones fisiológicas, la bomba de Na^+ no presenta "slippage" y no hay transporte de K^+ o Na^+ a favor de sus gradientes, por lo que la corriente producida por el ciclado de la bomba y sensible al inhibidor específico ouabaina es de dirección saliente. Sin embargo, en ausencia de Na^+ y K^+ extracelular, se ha reportado la permeabilidad de protones (H^+) a través de esta ATPasa. Los primeros reportes corresponden a

Rakowski *et al.* (1991), quienes describieron la existencia de una corriente entrante a través de la ATPasa. Estudios posteriores confirmaron éste fenómeno (Efthymiadis *et al.*, 1993, Wang & Horisberger, 1995, Vasilyev *et al.*, 2004). En todos los casos se observa una corriente rectificadora entrante, dependiente de pH, sensible a inhibidores específicos de la Na/K ATPasa y bloqueada por la presencia de concentraciones saturantes de los cationes transportables en el lado extracelular de la membrana, incluido el Na^+ (en concentraciones mayores a 5 mM). Wang & Horisberger postulan que *“una explicación probable para nuestros resultados sería que la barrera que cierra el acceso intracelular en la conformación E2, a pesar de ser eficiente para Na^+ y K^+ , no es suficientemente ceñida para protones”*. Por su parte, Vasilyev *et al.* proponen que *“la energía de activación requerida para la transición desde $\text{Na}_3\text{E1ATP}$ a $\text{Na}_3\text{E1P}$ se reduce debido a la acidificación del medio externo, abriendo un pasaje conductivo para H^+ y Na^+ [éste último a concentraciones menores a 25 mM]. Esto es equivalente a aumentar la probabilidad de apertura de la más interior de dos “compuertas” responsables de la oclusión de Na^+ dentro de la enzima”*. La vía de pasaje de protones a través de la ATPasa se desconoce. Un estudio relativamente reciente postula que el pasaje de protones se da a través del sitio exclusivo de unión de Na^+ debido a la correlación entre mutaciones en el sitio exclusivo y cambios correspondientes en la corriente de protones (Li *et al.*, 2006). Este pasaje podría darse a través de una estructura tipo canal o un mecanismo *“proton-wire”* como el observado en canales de gramicidina.

El guanidinio (gua^+ , CH_6N_3^+) es la forma protonada de la guanidina, producto de descomposición de la guanina. Fue descrito por B. Hille en 1971 como uno de los cationes orgánicos que pueden permear a través de canales de Na^+ voltaje dependientes (Hille, 1971). Más recientemente, fue descrito su transporte a favor de gradiente (con características similares a los protones descritos más arriba) por bombas de Na/K expresadas heterológicamente en oocitos de *Xenopus*, en condiciones en que Na^+ y K^+ están presentes en concentraciones subsaturantes en el lado extracelular (Yaragatupalli *et al.*, 2009). En un registro de clampeo de voltaje de dos electrodos, en condiciones de 120 mM gua^+ extracelular, éstos investigadores observaron una corriente entrante (a favor de gradiente) que es sensible a ouabaína. No se conoce la vía de pasaje del ion, pero se ha propuesto que el gua^+ podría, como los protones, pasar a través del sitio exclusivo cuando los sitios compartidos no están ocupados. Consistentemente con esto se observa que el gua^+ provoca una inhibición voltaje dependiente de la corriente de bomba en concentraciones saturantes de K^+ . Esta observación puede explicarse si el gua^+ entra al sitio exclusivo de Na^+ , una vez que el Na^+ es liberado, deteniendo así la liberación de los otros dos iones Na^+ (dado que el proceso es estrictamente secuencial).

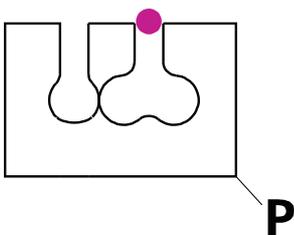


Fig. 2. Posibles vías de acceso iónico a los sitios de unión de la Na/K ATPasa.

A pesar de la disponibilidad de estructuras cristalinas de alta resolución de la ATPasa (Morth *et al.*, 2007, Ogawa *et al.*, 2009), el mecanismo de selectividad por iones no se comprende en profundidad. La existencia de una o dos vías de acceso iónico externo (una para los sitios comunes y otra para el sitio exclusivo) aún no ha sido clarificada. Es posible abordar este problema mediante el uso de bloqueadores del acceso a los sitios comunes, tal como el tetrapropilamonio (TPA). Cuando es aplicado del lado extracelular, el TPA actúa como un inhibidor competitivo del flujo de K^+ , bloqueando el acceso a los sitios comunes (sitios en que se une K^+) y enlenteciendo la desfosforilación y cambio conformacional provocados por la unión de K^+ a

los mismos sitios; en consecuencia mantiene a la bomba en E2-P (Gatto *et al*, 2005). Si pensamos en la existencia de dos vías de acceso, una hacia los sitios comunes y otra hacia el sitio exclusivo (ver Fig. 2), el TPA obstaculizaría el acceso a los sitios comunes pero no necesariamente el acceso al sitio exclusivo. Si por el contrario pensamos en una única vía de acceso hacia los tres sitios, entonces el TPA bloquearía el acceso a todos ellos.

Hipótesis

Dada la alta conservación de los sitios de unión de las Na/K ATPasas (Ogawa & Toyoshima, 2002), si estos fenómenos representan los mecanismos normales de la bomba, es esperable encontrarlos en bombas nativas de otros tipos celulares, tales como células de mamífero. Los miocitos ventriculares de cobayo se presentan como un buen modelo debido a que es posible su aislamiento para registro electrofisiológico y debido a la alta densidad de bombas en su membrana plasmática.

Objetivos

Este proyecto se enmarca dentro de los objetivos del laboratorio de comprender los mecanismos por los cuales la Na/K ATPasa distingue y selecciona entre Na⁺ y K⁺, y el sustrato estructural sobre el que se apoya.

Específicamente, busca corroborar la presencia de la corriente de Na⁺ y de H⁺ en Na/K ATPasas nativas de células de mamíferos, así como caracterizar éstas corrientes en mayor detalle y sus implicaciones para las características de los sitios de unión. Esto hará posible una comprensión más profunda del proceso de selectividad y permeabilidad de la bomba.

Metodología

Los experimentos fueron realizados con la técnica de *patch clamp* en formato de célula entera, desarrollada por Erwin Neher y Bert Sackman en los años 80. Esta técnica posibilita la medición de corrientes pequeñas a través de la membrana, con condiciones intra y extracelulares finamente controladas y una velocidad de clampeo relativamente rápida. Los miocitos ventriculares se presentan como un buen modelo para el estudio de la ATPasa por su alta densidad de bombas en la membrana plasmática así como también la posibilidad de aislarlos de modo de eliminar la interferencia por conexiones con células adyacentes.

Los cobayos fueron obtenidos del bioterio con un peso aproximado de 300 grs., anestesiados intraperitonealmente con pentobarbital, los corazones extraídos y la aorta canulada en un aparato de Langendorf. El corazón fue digerido enzimáticamente y cortado (Nakao & Gadsby, 1989).

Los registros se hicieron dentro de las 36 horas luego de el aislamiento en un microscopio invertido, con un sistema de perfusión de 8 canales que permitió el recambio de la solución externa (30 s). Los datos fueron obtenidos en una PC utilizando el software PClamp 10.2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), amplificador (AxoPatch 200B, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y conversor analógico digital (Digidata 1440, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Para los registros en gua^+ la solución externa consta de (en mM): 140 ácido metansulfónico, 10 HEPES, 10 HCl, 1 MgCl_2 , 1 CaCl_2 , 5 BaCl_2 , 1 CdCl_2 , 160 del catión correspondiente (NaCl o guaCl), pH 7.4 ± 0.05 . Para los registros de pH la solución externa consta de (en mM): 160 ácido metansulfónico, 10 HEPES, 10 MES, 10 TAPS, 1 MgOH_2 , 1 CaOH_2 , 5 BaOH_2 , 1 CdCl_2 , 155 del catión correspondiente (NaOH o NMDG^+), pH 7.4 o 6.0 ± 0.05 . La solución intrapipeta consta de (en mM): 100 CsOH, 50 NaOH, 130 ácido L-glutámico, 10 HEPES, 10 EGTA, 10 TEACl, 5 MgATP, 1 MgCl_2 , pH 7.4 ± 0.05 (Artigas & Gadsby, 2004). Como inhibidor de la bomba se utilizó dihidro-ouabaina (DHO, un inhibidor específico y reversible de la bomba de Na^+). En las maniobras con TPA se adicionó 10mM TPA-MS o 10mM NMDG-MS a la solución externa (de esta manera se excluye la posibilidad que los efectos de TPA se deban al cambio de osmolaridad).

La estimulación se realizó con pulsos cuadrados de 50 ms de duración desde -180 mV a 40 mV en saltos de 20 mV. El potencial de membrana de reposo se mantuvo a -40 mV y el intervalo entre los pulsos a 30 s. Los experimentos se realizaron con un registro continuo de entre 20 y 50 minutos, dependiendo del número de maniobras. En una misma célula se realizaron protocolos de pulsos por duplicado para cada solución externa. En un experimento tipo de corriente de protones con TPA, se comienza por solución externa de Na^+ , adicionando posteriormente K^+ para corroborar la actividad de la bomba en condiciones fisiológicas. Una vez registrada la corriente de bomba se inhibe con dihidro-ouabaina (para verificar que efectivamente la corriente observada se esté dando a través de la ATPasa) y luego se lava el inhibidor y se comprueba que la actividad de la bomba vuelva a su magnitud inicial. Se comienza entonces con el experimento propiamente dicho, las soluciones externas se intercambian en la siguiente secuencia: NMDG^+ pH 7.4, NMDG^+ pH 6.0, NMDG^+ pH 6.0 + TPA, NMDG^+ pH 6.0 + TPA + DHO, NMDG^+ pH 6.0 + DHO, NMDG^+ pH 6.0, NMDG^+ pH 7.4. En los casos en que fue posible (las condiciones ácidas en ésta solución no favorecen la permanencia saludable del parche) se corroboró nuevamente la actividad de la bomba en condiciones fisiológicas luego de las maniobras, en todos los casos se encontró inalterada (se muestra un registro continuo en solución externa de guanidinio en el Anexo).

Resultados

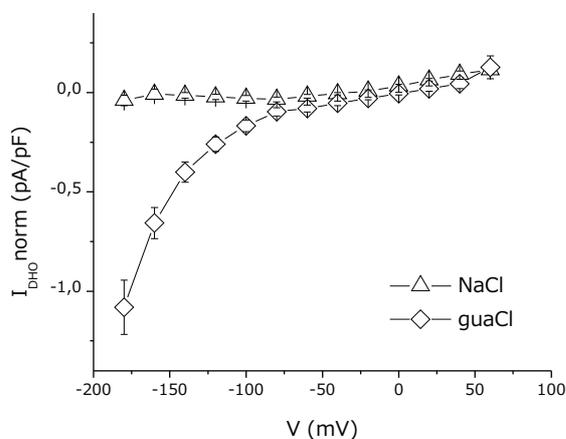


Fig. 3. Corriente de estado estacionario de guanidinio sensible a DHO. Relaciones corriente voltaje de Na^+ (triángulos, $n=9$ células) y gua^+ (rombos, $n=14$ células) normalizadas por la capacidad de cada célula, proporcional a la superficie de membrana. Los puntos muestran promedio y error estándar.

I. Guanidinio. A 155 mM guanidinio en la solución externa, se observa una corriente entrante sensible a DHO, tal como se esperaba dada la alta conservación de la Na/K ATPasa. La amplitud varía según el tamaño de la célula en un rango de entre 100 y 300 pA. En la Fig. 3 se muestran las relaciones corriente-voltaje de la corriente de gua^+ sensible a DHO en relación a la corriente de Na^+ sensible a DHO; se observa un aumento significativo respecto a la corriente en Na^+ tanto en el promedio como en una misma célula (ver anexo). Con el objetivo de corroborar que la corriente

observada fuera efectivamente transportada por iones gua^+ se hicieron registros disminuyendo la concentración de gua^+ , en éstos se observa una disminución de la corriente observada proporcional al cambio en la concentración del ion (los datos no se muestran)*.

II. pH. Los registros de corriente de protones se llevaron a cabo en solución externa de N-metil-D-glucamina (NMDG⁺), un azúcar que se sabe no permea a través de la membrana plasmática, en ausencia de Na⁺ y K⁺ en el exterior de la célula. Se observa una corriente entrante dependiente de pH y sensible a DHO (Fig. 4), tal como la reportada anteriormente en otros modelos. A pH 6.0 la corriente entrante presenta una amplitud, en promedio, de 1.31 pA/pF, esto es, aproximadamente, 260 pA de corriente sensible a DHO en una célula de 200 pF, un amplitud no despreciable.

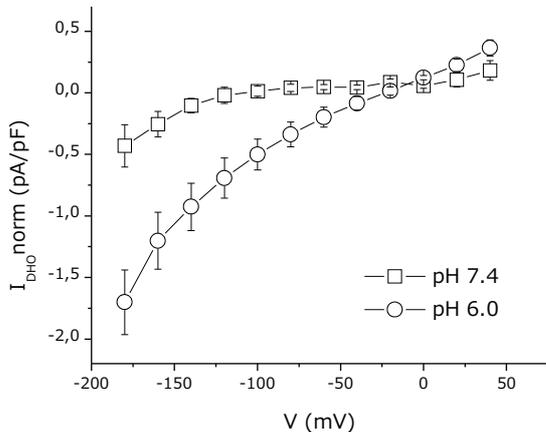


Fig. 4. Corriente dependiente de pH en ausencia de Na⁺ y K⁺ externo sensibles a DHO. Relaciones corriente-voltaje para solución de NMDG⁺ a pH 7.4 (cuadrados, n=8 células) y a pH 6.0 (círculos, n=10 células). Los puntos muestran promedio y error estándar.

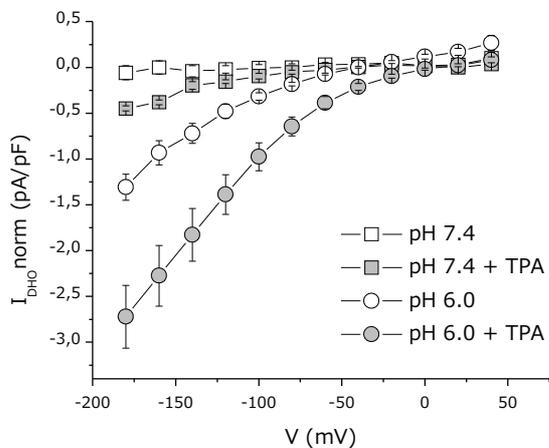


Fig. 5. Corriente de protones sensible a DHO al aplicar TPA. Relaciones corriente voltaje a pH 7.4 (cuadrados) y pH 6.0 (círculos) en ausencia y presencia de TPA (símbolos vacíos y llenos respectivamente); n=5 células en todos los casos. Los puntos muestran promedio y error estándar.

Con la intención de determinar la vía de pasaje, se repitieron los experimentos aplicando tetrapropilamonio (TPA). En estas condiciones, a pH 6.0 la magnitud de la corriente entrante se duplica (ver Fig. 5). Este aumento que también se observa aún a pH 7.4, podría implicar que el pasaje de protones a través de la ATPasa ocurre a través de una vía distinta a la que transita el K⁺ hacia los sitios comunes.

Discusión

Los objetivos iniciales de corroborar el pasaje de protones y guanidinio a través

de la Na/K ATPasa se cumplieron dentro de lo esperado. Podemos afirmar con seguridad que la permeación de guanidinio y la permeación de protones no son un artefacto de la preparación de oocitos, y que ambos son fenómenos presentes en sistemas biológicos en general. Este influjo desacoplado de cationes debe sumarse a los comportamientos no canónicos (que difieren del transporte de 3Na⁺ contra 2K⁺) tales como

* Los intentos de medir corriente de guanidinio en presencia de TPA en miocitos fueron fútiles. Proponemos realizar estos experimentos en otro modelo, tal como oocito de *Xenopus*, de modo de dilucidar la vía de pasaje y el sitio de unión.

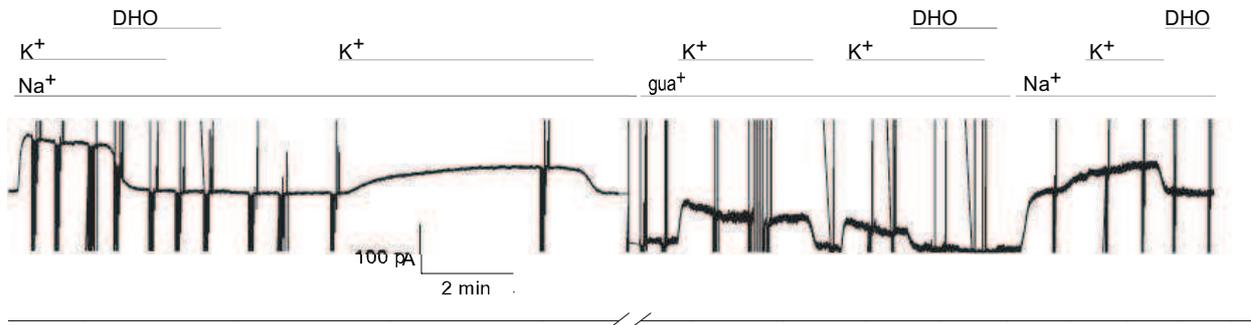
eflujo desacoplado de Na^+ y el intercambio Na/Na , entre otros. La permeación de cationes orgánicos se suma a esta complejidad y aporta datos para la comprensión del funcionamiento de la enzima.

El uso del TPA ha resultado ser una herramienta de mucha riqueza para la comprensión a nivel molecular de la ATPasa. Si nuestro conocimiento actual sobre el comportamiento del tetrapropilamonio en la ATPasa es correcto, los resultados obtenidos en el estudio de la corriente de protones parecen indicar que existirían dos vías de acceso a la bomba (ver Fig. 2), una de las cuales posibilita el pasaje de protones al lado intracelular, y que esta vía está asociada al sitio exclusivo de unión. Esto concuerda con lo reportado por Li & Horisberger en estudios de correlación entre mutaciones en el sitio exclusivo y pasaje de protones. Es posible que el TPA no solo bloquee el acceso a los sitios comunes sino que al impedir que estos sitios sean ocluidos, favorezca la formación de una estructura tipo canal que diera cuenta por este pasaje a través de la bomba; esto explicaría el aumento de la permeación de protones en presencia de TPA.

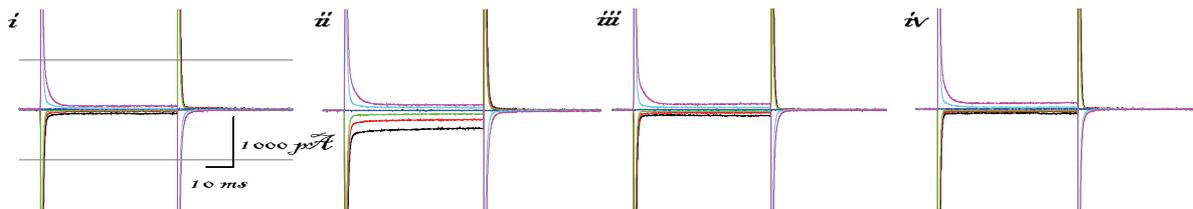
Referencias

- Artigas, P. & Gadsby, D.C. (2004) Large Diameter of Palytoxin-induced Na/K Pump Channels and Modulation of Palytoxin Interaction by Na/K Pump Ligands. *J. Gen. Physiology* **123**, 357-76.
- Dieste, A. (2009) *La invención inevitable - Eladio Dieste*, Cachimba del Piojo, Montevideo, 159p.
- Efthymiadis, A., Rettinger, J. & Schwarz, W. (1993) Inward directed current generated by the Na, K pump in Na and K free medium. *Cell Biol. Int.* **17**, 1107-1116.
- Gatto, C. Helms, JB. Prasse, MC., Arnett, KL., Milanick, MA. (2005) Kinetic characterization of tetrapropyl- ammonium inhibition reveals how ATP and Pi alter access to the Na⁺-K⁺-ATPase transport site. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**: C302–C311.
- Glitsch, HG. (2001) Electrophysiology of the sodium-potassium-ATPase in cardiac cells. *Physiol Rev.* **81**(4):1791-826.
- Hille, B. (1971) The Hydration of Sodium Ions Crossing the Nerve Membrane. *PNAS* **68**, No. 2, 280-82.
- Hille, B. (1971) The Permeability of the Sodium Channel to Organic Cations in Myelinated Nerve. *J. Gen. Physiology* **58**, 599-619.
- Hille, B. (1952) The Permeability of the Sodium Channel to Metal Cations in Myelinated Nerve. *J. Gen. Physiology* **59**, 637-58.
- Holmgren, M. *et al.* (2000) Three distinct and sequential steps in the release of sodium ions by the Na⁺/K⁺-ATPase. *Nature* **403**, 898-901.
- Li, C., Capendeguy, O., Geering, K. & Horisberger, J. D. (2005) A third Na⁺-binding site in the sodium pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12706-11.
- Morth, J.P. *et al.* (2007) Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* **450**, 1043-50.
- Nakao, M. & Gadsby, D.C. (1989) [Na] and [K] Dependence of the Na/K Pump Current-Voltage Relationship in Guinea Pig Ventricular Myocytes. *J. Gen. Physiology* **94**, 539-65.
- Nakao, M. & Gadsby D.C. (1989) Steady-State Current-Voltage Relationship of the Na/K Pump in Guinea Pig Ventricular Myocytes. *J. Gen. Physiology* **94**, 511-37.
- Ogawa H, Shinoda T, Cornelius F, Toyoshima C (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* **459**: 446-50.
- Ogawa, H. & Toyoshima, C. (2002) Homology modeling of the cation binding sites of Na/K ATPase. *PNAS* **99**, 15977-82.
- Rakowski, R.F., Vasilets, L.A., LaTona, J., Schwarz, W. (1991) A negative slope in the current-voltage relationship of the Na/K pump in *Xenopus* oocytes produced by reduction of external [K⁺]. *J. Membr. Biol.* **121**, 177-187.
- Takeuchi, A., Reyes, N., Artigas, P. & Gadsby, D. C. (2008) The ion pathway through the opened Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase pump. *Nature* **456**, 413-6.
- Vasilyev, A., Khater, K., Rakowski, R.F. (2004) Effect of extracellular pH on presteady-state and steady-state current mediated by the Na⁺/K⁺ pump. *J. Membr. Biol.* **198**(2), 65-76.
- Wang, X., Horisberger, J.D. (1995) A conformation of Na⁽⁺⁾-K⁺ pump is permeable to proton. *Am J Physiology* **268**, C590-5.
- Yaragatupalli, S. Olivera, J.F. Gatto, C. & Artigas, P. (2009) Altered Na⁺ transport after an intracellular α subunit deletion reveals strict external sequential release of Na⁺ from the Na/K pump. *PNAS* **106**, 15507-12.

Anexo



- I. Registro continuo en una célula a $V_h = -40$ mV. Corrientes de bomba activadas por K^+ (10 mM) e inhibidas por DHO, medidas en solución de Na^+ y gua^+ . Los trazos verticales corresponden a la aplicación de pulsos cuadrados de voltaje para la obtención de curvas I-V. Las barras horizontales indican los cambios de solución.



- II. Registros individuales en una misma célula en solución de $NMDG^+$, pulsos cuadrados de corriente desde -180 mV a +40 mV en saltos de a 20 mV (se muestran cada 40 mV). En el trazo ii se puede observar una corriente entrante que desaparece en el trazo iii al aplicar DHO. **i:** $NMDG^+$ pH 7.4 **ii:** $NMDG^+$ pH 6.0 **iii:** $NMDG^+$ pH 6.0 + DHO **iv:** $NMDG^+$ pH 7.4 + DHO.

