



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

# Tópicos de Biología

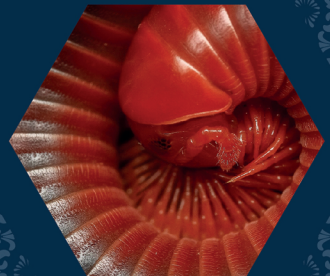
Salvador Galicia Isasmendi

José Lino Zumaquero Ríos

Verónica Cepeda Cornejo

Agustina Rosa Andrés Hernández

Coordinadores



**BUAP**

# TÓPICOS EN BIOLOGÍA

COORDINADORES:

Dr. Salvador Galicia Isasmendi

Dr. José Lino Zumaquero Ríos

Dra. Verónica Cepeda Cornejo

Dra. Agustina Rosa Andrés Hernández

# TÓPICOS EN BIOLOGÍA

COORDINADORES:

Dr. Salvador Galicia Isasmendi

Dr. José Lino Zumaquero Ríos

Dra. Verónica Cepeda Cornejo

Dra. Agustina Rosa Andrés Hernández



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

DIRECCIÓN GENERAL DE PUBLICACIONES

2024

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

*Rectora:* María Lilia Cedillo Ramírez · *Secretario General:* José Manuel Alonso Orozco · *Vicerrector de Extensión y Difusión de la Cultura:* José Carlos Bernal Suárez · *Director General de Publicaciones:* Luis Antonio Lucio Venegas

Primera edición, 2024

ISBN: 978-607-5914-14-5

DR © Benemérita Universidad Autónoma de Puebla  
4 Sur 104, Centro Histórico, Puebla, Pue., CP 72000  
Teléfono: 222 229 55 00  
[www.buap.mx](http://www.buap.mx)

Dirección General de Publicaciones  
2 Norte 1404, Centro Histórico, Puebla, Pue., CP 72000  
Teléfono: 222 246 85 59  
[libros.dgp@correo.buap.mx](mailto:libros.dgp@correo.buap.mx)  
[www.publicaciones.buap.mx](http://www.publicaciones.buap.mx)

Diseño de portada: Comunicación institucional, BUAP.

Soporte final: PDF, 2.5 Mb.





A los estudiantes, docentes e investigadores  
quienes con su esfuerzo diario  
crean, construyen, enseñan e investigan  
en favor de la construcción de una sociedad  
más justa, solidaria y emprendedora

## ÍNDICE

### Capítulo 1

Interacción insecto-planta mediada por compuestos orgánicos volátiles: el caso de coleópteros Melolonthidae y acacias, distribuidos en Puebla ..... 13

*Noe Yamil Pages Paez, Angel Alonso Romero López*

### Capítulo 2

Modulación cruzada entre los neurotransmisores glicina y GABA en médula espinal y estriado dorsal de la rata ..... 34

*Erika Lorena Arroyo-Ríos, Alexis Osvaldo Jiménez-Méndez, Jorge Luis Valente Flores-Hernández y Oswaldo Torres Ramírez*

### Capítulo 3

Modo de acción del beta agonista adrenérgico-clembuterol- $\beta_2$ AA-Clb, en bovinos..... 62

*Ricardo Enrique Caicedo Rivas, Mariana Paz-Calderón Nieto*

### Capítulo 4

Conocimiento y práctica de médicos respecto a enfermedades transmitidas por artrópodos ..... 95

*Ilse Francisco-Flores, José Lino Zumaquero-Ríos y César Antonio Sandoval-Ruiz*

### Capítulo 5

Toxoplasmosis. Una infección parasitaria grave en las poblaciones humanas en edad reproductiva..... 111

*José Lino Zumaquero-Ríos, Jorge Sarracent Pérez*

## Capítulo 6

Análisis cromosómico de *Peromyscus difficilis amplus* de San Pedro Atlixco, Tianguismanalco, Puebla ..... 137

*Jessica Usiel García Vivar, Rosa María González-Monroy, Jesús Martínez-Vázquez y Lucero Montserrat Cuautle García*

## Capítulo 7

Dieta del cacomixtle (*Bassariscus astutus*) en Zapotitlán Salinas, Puebla..... 165

*Raúl Neftali Herrera-Flores, Jesús Martínez-Vázquez y Rosa María González-Monroy*

## Capítulo 8

Empleo de reguladores de crecimiento en el cultivo *in vitro* de *Ampelocissus acapulcensis*..... 196

*Missael Molina Gorgonio, Verónica Cepeda-Cornejo y Dalia Molina-Romero*

## Capítulo 9

Revisión documental de las diferentes formas de inoculación para inducir la formación de agallas de *Ustilago maydis* en maíz. .... 219

*Daniel Sihuanca Mendoza, Noé Coba de la Cruz, María Leticia Calderón Fernández, Agustina Rosa Andrés-Hernandez*

## Capítulo 10

Jardín Botánico San Juan Bautista De La Salle: un espacio para la conservación y la educación ambiental en la zona norte de la Ciudad de México..... 237

*Carlos Alberto Ruiz Jiménez y Fabiola Dafne Saavedra Millán*

## PRÓLOGO

Tópicos en Biología, retoma los esfuerzos por cubrir una necesidad imperante de la comunidad de la Facultad en Ciencias Biológicas (FCB) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), por plasmar su propia identidad mediante la generación de conocimiento nuevo; conocimiento surgido del estudio de múltiples facetas de la Biología en el estado de Puebla. Quienes contribuyen a esta obra nos muestran a la biología como una ciencia de múltiples dimensiones, que no ciencias biológicas, la biología es una, con paradigmas estructuradores que dan coherencia a los múltiples campos.

Tópicos en Biología muestra una diversidad de temas que poseen entre ellas la conexión de llamar la atención sobre problemas de interés para el estado, desde el abordaje de técnicas de producción de alimentos tradicionales en México con el capítulo: Estudio sobre diferentes inóculos para inducir la formación de agallas de *Ustilago maydis*, hasta capítulos con casos emblemáticos de interacción entre acacias e insectos típicos de las zonas semidesérticas, que posee además el valor agregado de considerar el papel de compuestos odorantes poco reconocidos como herramientas de control biológico.

Forma una parte importante del libro el abordaje de problemas de salud en el estado de Puebla como una zona focal y de endemismos; en el capítulo sobre el conocimiento y práctica médica respecto a enfermedades transmitidas por vectores, queda patente la necesidad de una interacción mayor entre los especialistas en vectores y los profesionales de la salud.

Así mismo, el laboratorio de parasitología y vectores de la FCB, nos muestra un panorama desconocido y por ello preocupante sobre la toxoplasmosis y su incidencia en poblaciones humanas en edad reproductiva, siendo evidente la necesidad de ahondar el conocimiento no sólo científico de las enfermedades zoonóticas sino también en el conocimiento que la población en general tenga de ellas para así evitar conductas de riesgo, dado que los organismos portadores hacia el humano son muchas veces las que interaccionan con él como mascotas.

Otro problema de salud que si bien tuvo su pico máximo hace algunos años, no deja de ser un peligro latente por las ventajas económicas que conlleva, el uso del clenbuterol; en uno de los capítulos

de esta obra se describen los metabolitos que surgen con la ingesta del clenbuterol y sus concentraciones en bovinos destinados al consumo humano.

En un tema distinto pero asociado al cuidado del medio ambiente, el capítulo sobre el Jardín Botánico San Juan Bautista De La Salle, hace un interesante recordatorio sobre el papel que los Jardines Botánicos guardan como centros de educación, al abarcar programas múltiples como cursos, talleres, recorridos y conferencias para distintos sectores de la población, considerándolos como un medio importante no sólo para el aprendizaje, la investigación y la conservación ex situ de plantas, sino sobre todo para vincular a los sectores generadores de conocimiento formal y los sectores foco de la sociedad para que dichos conocimientos permeen y puedan eventualmente tener un significado y trascendencia en la vida de las comunidades.

Finalmente, en dos capítulos más, se trata el tema de dos especies emblemáticas ampliamente distribuidas en México, correspondiente a un roedor (*Peromyscus difficilis amplus*) y al cacomixtle (*Bassariscus astutus*). De este último podemos señalar que su estudio es fundamental para los biomas del estado de Puebla ya que es un excelente dispersor de semillas, las cuales se ven favorecidas en sus capacidades de germinación al pasar por el tracto digestivo de estos animales, pero sobre todo los cacomixtles tienen un papel fundamental como controladores de plagas asociadas a roedores e insectos. El registro de sus conductas alimenticias reviste un papel especial ya que una descripción de su estado y de las condiciones medioambientales que privan en su entorno, repercute a su vez en nuestro conocimiento para la conservación del medio ambiente. Por su parte *Peromyscus difficilis amplus*, endémico de México, ha sido ampliamente utilizado en estudios de ecología, comportamiento, fisiología, sistemática y evolución; mediante el estudio del cariotipo podemos observar, al compararse con registros previos y de otras localidades, la tendencia a la diversificación por lo que esta especie es un buen ejemplo de una especie politépica y excelente modelo para el entendimiento del papel que la deriva genética, la selección natural y las barreras geográfica juegan en la genética evolutiva.

Esperando que Tópicos en Biología sea el primero de una serie de publicaciones que ahonden en el quehacer de la Biología desde una



perspectiva local pero siempre aportando al entendimiento global de los problemas básicos de la biología, los problemas de salud y medioambientales.

Salvador Galicia Isasmendi

## INTRODUCCIÓN

El presente libro es una recopilación de las investigaciones realizadas por los trabajos de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Las aulas y laboratorios son espacios en los que día a día se genera nuevo conocimiento, así también se reconoce la importancia de difundir la investigación que se genera al interior del ámbito académico. Debemos dar oportunidad a que los resultados que se generan en la investigación por estudiantes, docentes e investigadores sean difundidos y con ello dar paso al inicio de nuevas investigaciones. La búsqueda de conocimiento es siempre una constante y el común denominador de las instituciones educativas. Es así como el presente documento tiene como objetivo difundir las investigaciones que se realizan al interior de la FCB.

En el capítulo 1, “Interacción insecto-planta mediada por compuestos orgánicos volátiles: el caso de coleópteros Melolonthidae y acacias distribuidos en Puebla”, se aborda el tema de las interacciones planta-hospedero y la importancia de los compuestos orgánicos volátiles (COVs). El estudio se concentra en el papel que dichos compuestos tienen para *Macrodactylus mexicanus* Burmeister, un escarabajo de la familia Melolonthidae, en la localización de sus plantas hospederas.

El capítulo 2, “Modulación cruzada entre los neurotransmisores glicina y GABA en médula espinal y estriado dorsal de la rata”, nos describe los mecanismos de comunicación que se ejecutan a través de las neuronas. En el núcleo estriado existen los receptores glicinérgicos (GlyR's) y tras su activación participan en la regulación de la liberación de determinados neurotransmisores como la acetilcolina. El estudio muestra que las respuestas neuronales no solo dependen de la liberación y la activación de receptores únicos, sino que existe una co-liberación necesaria para regular la activación de receptores y regular los circuitos neuronales. El conocimiento de estos mecanismos es importante para la comprensión en la coordinación motora y en los patrones de locomoción.

El capítulo 3, “Modo de acción del beta agonista adrenérgico-clembuterol- $\beta$ 2AA-Clb, en bovinos”, se enfoca en determinar cuáles son los metabolitos que surgen con la ingesta del clembuterol y sus posibles derivados que se almacenan en la estructura hepática, páncreas, glándula

suprarrenal, músculos y órganos genitales, este modelo principalmente en bovinos.

En el Capítulo 4, “Conocimiento y práctica de médicos respecto a enfermedades transmitidas por artrópodos”, se exploran en una encuesta los efectos etiológicos modos de transmisión, manifestaciones clínicas, prevención y tratamiento de las enfermedades transmitidas por artrópodos. Los resultados muestran áreas de oportunidad para mejorar los programas de estudio de licenciatura y el tratamiento a pacientes.

En el capítulo 5, “Toxoplasmosis. Una infección parasitaria grave en las poblaciones humanas en edad reproductiva”, muestra los resultados de un estudio realizado a 100 mujeres gestantes en la ciudad de Puebla; de las cuales 44 dieron positivas a la presencia de anticuerpos anti-*T.gondii*. Los resultados señalan la importancia de una campaña de medidas de prevención y tratamiento oportuno.

En el capítulo 6, Análisis cromosómico de *Peromyscus difficilis amplus* de San Pedro Atlixco, Tianguismanalco, Puebla”, se examina el cariotipo en organismos de la especie *Peromyscus difficilis amplus* provenientes de San Pedro Tianguismanalco, Puebla. El resultado es  $2n=48$  y  $NF=52$ . El cromosoma sexual X fue submetacéntrico y el sexual Y fue telocéntrico. Asimismo, la especie presenta en su mayoría por cromosomas telocéntricos.

En el capítulo 7, “Dieta del cacomixtle (*Bassariscus astutus*) en Zapotitlán Salinas, Puebla”, se determinó la dieta del cacomixtle a partir de heces fecales, en dos zonas en Zapotitlán Salinas, Puebla. La dieta de *Bassariscus astutus* en matorral xerófilo está conformada por plantas, reptiles, aves, artrópodos, gasterópodos, mamíferos y peces. Mientras que, en bosque de cactáceas, *Bassariscus* consume plantas, reptiles y aves; y de forma complementaria consume: artrópodos, mamíferos y gasterópodos.

En el capítulo 8, “Empleo de reguladores de crecimiento en el cultivo in vitro de *Ampelocissus acapulcensis*”, se muestran las mejores condiciones y concentraciones de reguladores del crecimiento necesarias para la inducción a callo del tejido vegetativo de la uva silvestre *Ampelocissus acapulcensis*. Los resultados muestran que los mejores reguladores para la inducción a callos son: 1) 6-bencilaminopurina (BAP) en combinación con ácido naftalenacético (ANA), 2) BAP en

combinación con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 3) kinetina (KIN) en combinación con 2,4-D. Los resultados son de utilidad en la industria biotecnológica.

El capítulo 9, “Revisión documental de las diferentes formas de inoculación para inducir la formación de agallas de *Ustilago maydis* en maíz”, nos muestra una revisión bibliográfica de los procesos de inoculación del maíz por el hongo parasito denominado como huitlacoche (*Ustilago maydis*). Se aborda una metodología asertiva para la producción del hongo. El trabajo concluye que el mejor método de propagación es por medio líquido, utilizando la inoculación por inyección.

En el capítulo 10, “Jardín Botánico San Juan Bautista De La Salle: Un espacio para la conservación y la educación ambiental en la zona norte de la Ciudad de México”, nos enfatiza en el importante papel que tienen los jardines botánicos como reservorios biológicos y su papel en la conservación. El trabajo muestra el proceso de creación del Jardín Botánico San Juan Bautista De La Salle, en CDMX, siguiendo el método establecido para Jardines Botánicos publicado por SEMARNAT con fines de educación ambiental y conservación de especies.

Con diez capítulos, Tópicos en Biología recopila los trabajos de investigación actualmente realizados por los investigadores de la FCB, para conocimiento y difusión entre la comunidad académica y público en general.

Verónica Cepeda Cornejo

## Capítulo 1

# Interacción insecto-planta mediada por compuestos orgánicos volátiles: el caso de coleópteros Melolonthidae y acacias, distribuidos en Puebla

Noe Yamil Pages Paez<sup>1</sup>, Angel Alonso Romero López<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma de Tlaxcala, Facultad de Ciencias Biológicas, Carretera Tlaxcala-Puebla S/N, La Loma Xicotencatl, Tlaxcala, México, C.P. 90070. yamilpages@gmail.com

<sup>2</sup> Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Biológicas, Blvd. Valsequillo y Av. San Claudio, Edificio 112-A, Ciudad Universitaria, Col. Jardines de San Manuel, Puebla, C.P. 72570.

\*Autor de correspondencia: alonso.romerolopez@correo.buap.mx

### RESUMEN

El estudio de las interacciones insecto-planta se relaciona prioritariamente con los compuestos orgánicos volátiles (COVs), sustancias producidas y emitidas por las plantas a partir de su metabolismo secundario, las cuales resultan fundamentales para su defensa, protección y comunicación (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007). El tema de interacciones insecto-planta hospedera en los Coleoptera Melolonthidae que se distribuyen en México ha generado interés entre algunos especialistas en Ecología química, enfocando la atención en los hábitos y comunicación de estos insectos (Romero-López, 2016). Los estudios en este sentido se han concentrado especialmente en adultos de *Macrodactylus mexicanus* Burmeister (“frailecillos”), para los cuales se ha obtenido información sobre la localización de sus plantas hospederas por COVs (Romero-López, 2016; Morales-Blancas y Romero-López, 2019; 2020; Nieves-Silva y Romero-López, 2019; Moctezuma-Vega y Romero-López, 2020). Para dar seguimiento al esquema de comunicación química de esta especie de Melolonthidae con relación a nuevos reportes de hospederas y los COVs que producen-liberan, en el presente estudio se describe el comportamiento de localización por parte de los adultos de



*M. mexicanus* al momento de su interacción con arbustos de *Acaciella angustissima* (Mill.) Britton & Rose (“acacias”), ambas especies distribuidas en el Cerro Zapotecas, ubicado en el municipio de San Pedro Cholula, Puebla México. Simultáneamente, se confirma la actividad biológica de hojas y flores de esta planta en adultos de estos coleópteros, con base en bioensayos de laboratorio. Se obtuvo la secuencia general del comportamiento de adultos de *M. mexicanus* en la interacción con su planta hospedera, describiendo cinco tipos de desplazamientos y tres patrones desde el momento en que los adultos de *M. mexicanus* localizan mediante el desplazamiento aéreo sus plantas hospederas, hasta la permanencia en las flores de estas. Además de obtener respuestas positivas significativas hacia macerados de hojas+flores de *A. angustissima* respecto al control, confirmando la actividad atrayente de los COVs de ambas estructuras vegetales.

**Palabras clave:** *Macroductylus mexicanus*, *Acaciella angustissima*, COVs comportamiento, actividad biológica

## INTRODUCCIÓN

### **Interacciones insecto-planta y compuestos orgánicos volátiles (COVs)**

El resultado de las interacciones entre los organismos genera procesos ecológicos y evolutivos que definen la dinámica de su coexistencia (Gutiérrez-Zamora, 2008). Esto conduce a diferentes tipos de asociaciones, favorables o desfavorables como puede serlo la simbiosis y sus extremos; mutualismo y parasitismo (Martínez-Fernández y Cordero del Campillo, 2002). El estudio de las interacciones que se establecen entre los seres vivos genera información invaluable sobre procesos biológicos, origen y evolución, además de obtener detalles sobre las sustancias químicas que median las relaciones ecológicas resultantes (Anaya-Lang y Espinosa-García, 2006). Las interacciones entre insectos y plantas son de las que más interés han despertado entre los especialistas y se ha evidenciado que todas se encuentran mediadas por compuestos orgánicos volátiles (COVs) (Cantúa-Ayala *et al.*, 2019), siendo también el

método de comunicación más antiguo, evolucionando de productos químicos a señales y, por último, a transferencia de mensajes (Leonhardt *et al.*, 2016). La producción de los COVs se da por el metabolismo secundario de las plantas como estrategia ante diversas condiciones bióticas y abióticas (Baldelomar *et al.*, 2018), reportándose principalmente en aquellas que forman parte de las familias Apiaceae, Lauraceae, Myristicaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Rosaceae, Piperaceae, Verbenaceae y Rutaceae (Soto-Vázquez *et al.*, 2019). Los COVs generalmente son mezclas complejas de compuestos de bajo peso molecular, en su mayoría son de olor agradable, aunque se encuentran algunos con compuestos azufrados, insolubles y se volatilizan a temperatura ambiente, siendo los terpenos los más relevantes (Martínez, 2001; Marín-Loaiza y Céspedes, 2007; Ávalos-García y Pérez-Úrria, 2009). Dentro de las interacciones planta-insecto, los COVs juegan un rol importante en la comunicación, ya que además de brindar beneficios a las plantas como mecanismos de defensa, atracción y repelencia de organismos y microorganismos, promueven la reproducción, atracción de polinizadores y dispersión de semillas (Cantúa-Ayala *et al.*, 2019). Otras actividades positivas al ecosistema atribuibles a estos volátiles es disuadir interacciones dañinas con insectos fitófagos, competir por recursos y comunicarse entre plantas, además de ser un indicador del estado fisiológico de las plantas (Ninkovic *et al.*, 2021).

### **Interacciones “coleópteros Melolonthidae-plantas hospederas” en México**

La familia Melolonthidae es un grupo de coleópteros que se caracterizan por mostrar un labro y mandíbulas parcialmente expuestas u ocultas bajo el clipeo, mandíbulas esclerosadas, antenas formadas por 8-10 artejos, 3 a 7 correspondientes a la maza antenal. Presentes en todos los hábitats continentales, insulares y algunos lénticos, excepto en ambientes con hielos perennes. Se encuentran desde el edafón hasta el dosel, alimentándose de hojas, flores, tallos, frutos, polen, néctar, savia, corteza, detritus vegetal y rara vez depredan otros coleópteros. De acuerdo con su comportamiento, se han centrado estudios por la comunicación química y el comportamiento sexual como el

comportamiento precopulatorio, ubicando la fase en la que se involucran las sustancias químicas (Romero-López, 2006). Este taxón se compone de 5 subfamilias (Melolonthinae, Rutelinae, Dynastinae, Cetoniinae y Trichiinae), 127 géneros y 1179 especies (Morón *et al.*, 2014).

La elección de una planta como hospedera por parte de los insectos está relacionada con la calidad del recurso alimentario, la fecundidad y la frecuencia de oviposición (López *et al.*, 1999), a través de una secuencia comportamental en la cual el insecto distingue entre su planta hospedera y la que no lo es mediante la búsqueda, localización y aceptación del sitio por medio de los COVs (Romero-López, 2016). Para los coleópteros Melolonthidae se cuenta con registros de atracción en adultos de *Melolontha hippocastani* F. (Ruther *et al.*, 2000, 2001, 2002), *Melolontha melolontha* L. (Reinecke *et al.*, 2002) y *Maladera matrida* Argaman (Yarden y Shani, 1994) hacia volátiles de sus plantas hospederas *Carpinus betulus* (L.) y *Quercus rubra* (L.), así como en cultivos de *Arachis hypogaea* (L). En particular, para especies distribuidas en México como *Phyllophaga obsoleta* Blanchard y *Phyllophaga ravida* Blanchard se registra la interacción de adultos con árboles de encino (*Quercus* spp.) (Romero-López *et al.*, 2007), así como el comportamiento de adultos de *Macroductylus subspinosus* F. (Heath *et al.*, 2001), *Macroductylus nigripes* Bates y *Macroductylus mexicanus* Burmeister al interactuar con hojas de diversas especies vegetales como *Festuca arundinacea* (Schreb.), *Dactylis glomerata* (L.), “maíz” *Zea mays* (L.) y “azumiate” *Baccharis salicifolia* (Ruíz & Pav. Pers.) (Romero-López, 2016). Destacan las pruebas químico-ecológicas con COVs emitidos y liberados por hojas de *B. salicifolia*, los cuales atraen a adultos de *M. nigripes* que a su vez muestran desplazamientos dirigidos hacia ellas (Nieves-Silva y Romero-López, 2019), así como las respuestas de *M. mexicanus* hacia COVs liberados por hojas y flores de “palo dulce” *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg. (Morales-Blancas y Romero-López, 2019; 2020). Adicionalmente, se han llevado a cabo observaciones con adultos de *M. nigripes* y *M. mexicanus*, registrando los patrones de comportamiento mostrados como respuesta hacia COVs de hojas de azumiate (Nieves-Silva y Romero-López, 2019) y encino (Moctezuma-Vega y Romero-López (2020), así como a hojas y flores de palo dulce (Morales-Blancas y Romero-López, 2019, 2020), en etogramas, únicos en su tipo.

### **Interacción *Macroductylus mexicanus*-*Acaciella angustissima***

Los miembros de *M. mexicanus* (Figura 1) se distribuyen principalmente en las entidades mexicanas de Oaxaca, Puebla, Veracruz, Estado de México, Distrito Federal, Michoacán, Jalisco, Durango, Morelos, Hidalgo, Tlaxcala, Querétaro, Zacatecas, Coahuila y Baja California Norte. Se trata de insectos activos durante los meses de mayo a septiembre, presentes en ambientes templados, fríos o semi-cálidos, entre los 100 y 2,650 m de altitud; los adultos presentan cabeza negra, artejos pardo-rojizos, piezas bucales negras, pronoto negro con vestidura setífera amarilla o grisácea recumbente, élitros con el integumento del disco rojizo ceniciento, meso y metatibias rojizas con los ápices oscuros, siendo notoria la diferencia de abdomen entre machos y hembras, más convexo y amplio el de estas últimas (Arce-Pérez y Morón, 2000). En el contexto de su comunicación química, se ha evidenciado que las hembras liberan atrayentes sexuales que atraen a los machos para la cópula y que ambos sexos son atraídos por aleloquímicos liberados por sus plantas hospederas (Romero-López, 2016). En ambos casos, las estructuras principales para la recepción de estas sustancias químicas son las sensilas o quimiorreceptores localizados en ambas caras de las lamelas antenales, resaltando las placoideas-auricfílicas como las potenciales sensillas que captan atrayentes sexuales y las basicónicas-celocónicas como los primeros sitios de contacto con los COVs (Romero-López *et al.*, 2017).



**Figura 1.** Macho de *Macroductylus mexicanus* posado sobre hojas de *Acaciella angustissima* en la zona de estudio del “Cerro Zapotecas”. Es posible

apreciar parte de lo que se ha considerado como el arreglo y posición de las lamelas antenales, característico de estos insectos en la interacción mediada por compuestos orgánicos volátiles de su planta hospedera. Foto: Yamil Pages.

Por otro lado, los arbustos de *A. angustissima* (Figura 2) son reportados como vegetación secundaria con una distribución neotropical presentando inflorescencias en fascículos conformados por cabezuelas, integradas por 10-12 flores pediceladas con simetría actinomorfa, en su mayoría las flores son hermafroditas con 280-360 estambres con filamentos libres entre sí pero unidos a la base (Rico-Alvarado y Gomez-Acevedo, 2022), carecen de espinas, nectarios y glándulas estaminales llegando a medir hasta 12 m (Rico-Arce y Bachman, 2006). De acuerdo con la producción de COVs se sabe que las hojas de estos arbustos producen  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -mirceno (Pages-Paez, 2021), además de taninos en su corteza, utilizados para curtir pieles (Rincón-Rosales y Gutiérrez-Miceli, 2008).

Recientemente para la interacción “*Macroductylus mexicanus*-*Acaciella angustissima*” se han identificado por cromatografía de gases y espectrometría de masas los COVs de las hojas de la planta y se ha modelado *in silico* la interacción molecular entre proteínas de unión a olores (OBPs, por sus siglas en inglés) reportadas para otros Melolonthidae y los COVs más abundantes, obteniéndose la energía de acoplamiento y las interacciones con los residuos de aminoácidos de las proteínas. Esto se ha considerado como la primera evidencia de actividad biológica en esta interacción, simulando la respuesta quimio-antenal por parte de los adultos de *M. mexicanus* a los volátiles liberados por las hojas de la acacia (Pages-Paez, 2021).





**Figura 2.** *Acaciella angustissima* en la zona de estudio del “Cerro Zapotecas”. A) Arbusto ubicado entre otras acacias que se eligieron para llevar a cabo los registros de observación de las interacciones con adultos de *Macroductylus mexicanus*. B) Hojas y flores que muestran su disposición en la parte media y superior de cada uno de los arbustos bajo observación. Fotos: Yamil Pages.

## MÉTODOS PARA ESTUDIO DE INTERACCIONES “MELOLONTHIDAE-PLANTA HOSPEDERA”

### Registros de observación en hábitat natural

Los estudios de observación en campo permiten detectar, interpretar y medir el comportamiento de los insectos, como su alimentación, reproducción y sus servicios ambientales, entre ellos la interacción con su planta hospedera y emisión de COVs; en este sentido, se han llevado a cabo estudios con abejas, hormigas, escarabajos y moscas (Reyes-Prado *et al.*, 2019). Para estudios con coleópteros Melolonthidae se han empleado como modelos de observación los adultos de *Phyllophaga cuyabana* Moser, *Holotrichia parallela* Motschulsky y *Maladera matrida* Argaman (Oliveira y García, 2003).

### Bioensayos en laboratorio con olfatómetro

El olfato en los insectos es de gran importancia ya que se relaciona con los patrones de comportamiento más importantes como son la alimentación, oviposición y la localización de pareja (López-Ávila y Rincón, 2006) por lo cual, se emplean los bioensayos, que son técnicas especializadas que nos permiten, bajo condiciones controladas, conocer las reacciones de los organismos bajo estudio (Ávila-Cervantes *et al.*, 2019). Un olfatómetro es un dispositivo que permite detectar, medir o evaluar respuestas de elección o preferencia de los organismos hacia diferentes estímulos, tanto en su forma pasiva (sin intervención de flujo de viento) como activa (mediante un constante flujo de viento) y que son usados tradicionalmente para las pruebas en la Ecología química. Existen diferentes diseños de olfatómetros con flujo de viento como los de vidrio de dos vías en “Y”, de cuatro vías con formas variadas, de cuatro, seis o más vías, principalmente de vidrio o acrílico. El de tubo en “Y” (Figura

3) permite evaluar la preferencia de los insectos hacia dos estímulos, un tratamiento y el control o bien, entre dos fuentes de COVs distintas (López-Ávila y Rincón, 2006) y es empleado generalmente para coleópteros de talla pequeña (Sánchez-Cruz, 2019). Los insectos se colocan individualmente en la entrada del brazo de liberación y el bioensayo llega a su fin cuando el organismo ha llegado a uno de los dos brazos del olfatómetro o que aún esté en el tubo de liberación y haya finalizado el tiempo de observación (López-Rodríguez *et al.*, 2009). Para Melolonthidae se han utilizado olfatómetros con diferentes características dependiendo del objetivo de cada estudio, ya sea para determinar la preferencia alimentaria o para evaluar la respuesta hacia atrayentes sexuales (Romero-López, 2016).

Para estandarizar el uso de olfatómetros que permitan generar información sobre la interacción que establecen los insectos y las plantas, en particular de la interacción frailecillo-acacia, además de complementar los estudios de comunicación química de *M. mexicanus*, en el presente trabajo se propone describir el comportamiento de localización por parte de estos coleópteros al primer momento de contacto con los arbustos de *A. angustissima*, ambas especies distribuidas en una zona no perturbada de Puebla, relacionándolo con las respuestas de los adultos hacia muestras de hojas y flores de esta acacia, en laboratorio.



**Figura 3.** Instrumental y equipo, empleados para llevar a cabo bioensayos activos con adultos de diversas especies de Melolonthidae y vegetales. A) Detalle del olfatómetro en “Y” de dos vías, con brazo central y brazos complementarios con

conexiones. B) Bomba de aire con sistema de conectores y flujómetro que forma el sistema de liberación-control del flujo de viento. Fotos: Yamil Pages.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Obtención de insectos, hojas y flores**

La recolecta manual de adultos de *M. mexicanus* se llevó a cabo entre junio y julio de 2022, en una zona aislada no perturbada del Parque Estatal “Cerro Zapotecas” (Figura 4) con coordenadas 19° 03' 38" y 19° 04' 55" N y 98° 19' 44" y 98° 20' 28" O (Periódico Oficial del estado de Puebla, 2014), el cual se ubica en la localidad de San Pedro Cholula, Puebla colindando con los municipios San Cristóbal Tepontla, San Juan Tlautla, San Gregorio Zacapecpan, San Francisco Coapa, San Sebastián Tepalcatepec, San Diego Cuachayotla y San Agustín Calvario (Tlapa-Almonte, 2005). En el lugar predomina un clima templado subhúmedo con lluvias en verano y con una temperatura media anual que fluctúa entre 18° y 20° C, con vegetación diversa de cultivos de temporada, árboles frutales, bosque de pino-encino y matorral xerófilo (Flores-Hernández, 2011). Después de observar el comportamiento de los coleópteros al interactuar con las ramas, hojas y flores de diferentes arbustos de *A. angustissima* durante 3 h, entre las 11:00 y las 14:00 hrs, horario con mayor actividad sexual y alimentaria de *M. mexicanus*, se capturaron esos y otros especímenes, trasladándolos en recipientes de plástico de 1 L con suelo en su interior al laboratorio de Infoquímicos y Otros Productos Bióticos (IOPB) de la Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP. Ahí, los adultos se determinaron taxonómicamente, además de separarlos por hembras y machos con base en lo propuesto por Arce-Pérez y Morón (2000). De igual forma, se recolectaron hojas y flores de *A. angustissima* de los arbustos considerados para las observaciones. La confirmación de la identidad taxonómica fue por parte del MPhil A. J. Coombes, curador del Jardín Botánico Universitario, BUAP.



**Figura 4.** Zona de arbustos de *Acaciela angustissima* ubicada al norte del “Cerro Zapotecas” en donde se llevaron a cabo las sesiones de observación de interacciones y recolecta del material biológico para los bioensayos en laboratorio. Foto: Yamil Pages.

### **Observación de interacciones en campo**

En la zona de estudio, se describió la trayectoria general y movimientos de los adultos de *M. mexicanus* con base en registros focales y continuos, desde el instante en que los insectos iniciaban sus vuelos hasta su primer contacto con alguna estructura vegetal de los arbustos de *A. angustissima*. En la descripción se consideró la frecuencia de cada desplazamiento de los adultos con respecto al tiempo de observación; en este caso, 15 min por insecto seleccionado. Se recopilaron filmaciones de las sesiones de observación con una cámara Canon EOS Rebel T7 (n=20).

### **Confirmación de actividad biológica en laboratorio**

Los bioensayos se llevaron a cabo en un horario de 11:00-14:00 hrs, en el espacio destinado en el cuarto de cría del Laboratorio de IOPB para este fin. Se empleó un olfatómetro de vidrio en forma de “Y”, de dos vías,

el cual consta de un brazo central de 14 cm y de dos brazos terminales de 13 cm cada uno, con un diámetro interior de 1.5 cm. Cada uno de los brazos está conectado a una cámara de vidrio de 6.5 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro interior y a su vez cada lado del olfatómetro se expone a un flujo de viento constante de 500 mL/min, 1 L/min en el tubo central, regulados por un flujómetro Cole Parmer, USA (Figura 3). Se pesaron en conjunto 3 g de hojas y flores en la balanza analítica LORMA M072, empleando 0.10 g para cada muestra, la cual se mezcló, maceró y depositó en un fragmento de papel filtro de 1 cm<sup>2</sup> para cada ensayo; en el caso del control, se impregnó el papel filtro con el equivalente de agua destilada. Se colocaron aleatoriamente los estímulos, tomando como respuesta positiva (taxia) el desplazamiento dirigido de los insectos desde el ingreso al brazo del olfatómetro hasta que se detectaba el contacto de patas o antenas con el papel filtro, mínimo durante 30 s. Cada bioensayo duró 5 min o hasta que se presentaran respuestas positivas o desplazamientos de cualquier tipo por parte de los coleópteros. Se utilizaron treinta adultos de *M. mexicanus*, quince machos y quince hembras (n=30).

### **Análisis de datos**

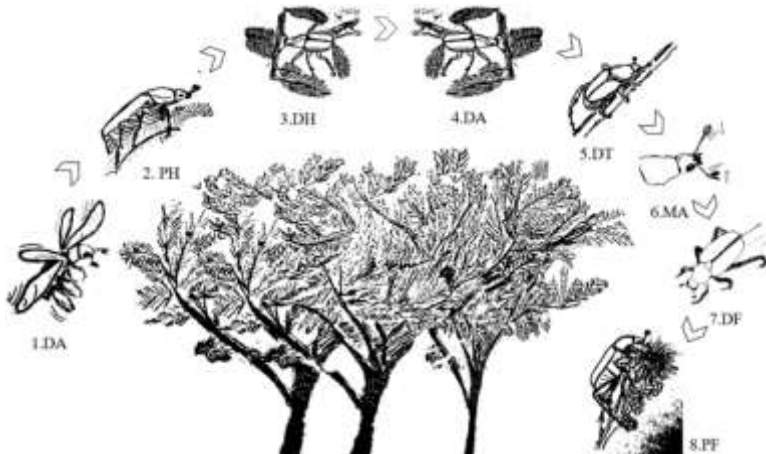
Para los registros de comportamiento en campo se consideraron aquellas trayectorias en que se apreciara que los adultos de *M. mexicanus* se desplazaban de forma aérea hacia algún arbusto de *A. angustissima*, registrando movimientos y posturas generales. Se recopilaban capturas y filmaciones desde el primer contacto de los frailecillos hasta su posado sobre las flores de cada acacia bajo observación, con una cámara Canon EOS Rebel T7. En el caso de los bioensayos en laboratorio, se obtuvieron capturas y filmaciones con el mismo equipo video-fotográfico, desde que se colocó al insecto en el tubo central del olfatómetro hasta que se presentara una respuesta positiva. Los datos en campo se ordenaron y analizaron como secuencia general de desplazamientos y patrones de comportamiento, con un enfoque estrictamente descriptivo y cualitativo. Por otro lado, los datos generados en laboratorio se analizaron mediante pruebas de Chi-cuadrada, utilizando el software Rstudio-R 4.2.1.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Observación de interacciones en campo

Se registraron cinco tipos de desplazamientos y tres patrones de comportamiento en las trayectorias y movimientos de los adultos de *M. mexicanus* en cuanto inician la interacción con los arbustos de *A. angustissima* (Figura 5): 1. Desplazamiento aéreo en dirección hacia arbustos, 2. Posado en hoja, 3. Desplazamiento a través del envés de hoja, 4. Desplazamientos aleatorios a través de la hoja, 5. Desplazamiento a través de tallo, 6. Movimiento antenal; 7. Desplazamiento hacia flor, 8. Posado en flor. En general, la secuencia general de estos desplazamientos y movimientos forman parte del etograma de la interacción *M. mexicanus*-*A. angustissima* (Pages-Paez y Romero-López, datos no publicados) y coincide con lo que se ha reportado para esta misma especie de Melolonthidae como respuesta hacia los COVs liberados por hojas de azumiate (Nieves-Silva y Romero-López, 2019), palo dulce (Morales-Blancas y Romero-López, 2019) y encinos (Moctezuma-Vega y Romero-López, 2020), así como para flores y brotes florales de palo dulce (Morales-Blancas y Romero-López, 2020), destacando que es el primer trabajo para hojas y flores en la interacción con una acacia de México.



**Figura 5.** Representación gráfica de la secuencia de la interacción entre adultos de *M. mexicanus* y arbustos de *A. angustissima*. 1. DA=desplazamiento

*aéreo en dirección hacia arbustos, 2. PH=Posado en hoja, 3. DH=desplazamiento a través del envés de hoja, 4. DA=desplazamientos aleatorios a través de la hoja, 5. DT=desplazamiento a través de tallo, 6. MA=movimiento antenal; 7. DF=desplazamiento hacia flor, y 8. PF=posado en flor. Esquema preparado por Yamil Pages.*

### **Confirmación de actividad biológica en laboratorio**

Los registros mostraron respuestas positivas estadísticamente significativas por parte de adultos de *M. mexicanus* hacia macerados de flor+hojas de *A. angustissima* con respecto al control ( $\chi^2 = 8.53$ ,  $p < 0.05$ , Figura 6). Las taxias de este tipo fueron abundantes en más del 90% del total de bioensayos, observándose respuestas y comportamiento parecidos en machos y hembras de estos insectos en olfatómetro: postura característica con movimientos de abdomen circulares y la apertura-movimiento de las lamelas antenales previo a los desplazamientos hacia el estímulo seleccionado, lo cual ya se ha observado en adultos del coleóptero *Melolonthidae Phyllophaga obsoleta* Blanchard, en olfatómetro de cuatro vías (Romero-López y Arzuffi, 2010). En el total de respuestas positivas tanto de machos como hembras se detectaron movimientos antenales previos a la entrada del brazo donde se encontraba el macerado de hojas+flores de *A. angustissima* y previo al contacto con el estímulo, indicando una captación de COVs mediante el flujo de viento dentro del olfatómetro.



**Figura 6.** Hembra de *Macrodactylus mexicanus* dirigiéndose hacia el macerado hojas+flores de *Acaciella angustissima*, en uno de los brazos del olfatómetro empleado en el presente estudio. Este desplazamiento se consideró como respuesta positiva en cada uno de los bioensayos. Foto: Yamil Pages.

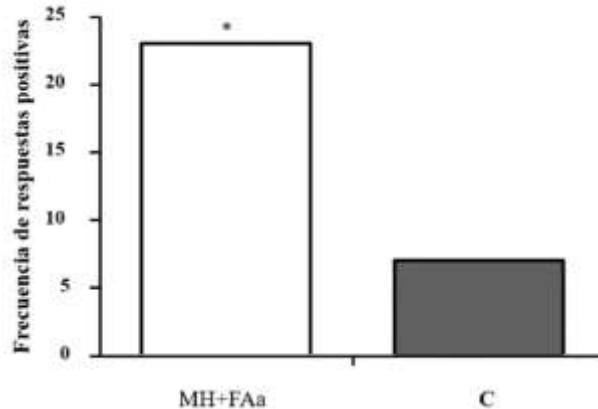
Se diferenciaron los tipos de respuestas de adultos de *M. mexicanus* hacia el estímulo y el control, considerando los movimientos actos y posturas de hembras y machos en el interior del brazo principal del olfatómetro (Cuadro 1). Una “respuesta positiva” es el desplazamiento dirigido hacia el estímulo con el contacto de patas o antenas en el estímulo, mientras que un “desplazamiento dirigido, pero sin contacto con el estímulo” mostraba un comportamiento previo en el cual el coleóptero captaba mediante el flujo de viento los COVs provenientes del estímulo, pero que no posaba sus patas sobre el estímulo y tampoco mostraba movimiento evidente de antenas. Por otro lado, los “desplazamientos aleatorios” son aquellos que no se dirigían hacia ningún brazo del olfatómetro, ya sea al estímulo o el control, mientras que los “desplazamientos dirigidos, pero sin contacto con el control” son aquellos sin comportamiento previo a la captación de COVs. Todas estas respuestas coinciden con lo reportado por Romero-López y Arzuffi (2010) al evaluar la respuesta de adultos de *P. obsoleta* hacia diferentes concentraciones de un potencial atrayente sexual, en un olfatómetro de cuatro vías; estos autores sugieren que las antenas lameladas de estos insectos son sensores de los estímulos químicos a los cuales están expuestos cotidianamente, permitiéndoles detectar lo que les provoca atracción a corta y larga distancia y de esta manera, modificar sus movimientos y desplazamientos sobre la marcha, si es necesario. Para destacar también el hecho de que tanto machos como hembras de *M. mexicanus* mostraron respuestas positivas significativas hacia el macerado de hojas+flores, con respecto al control (Cuadro 1, Figura 7), lo cual es consistente con el esquema de comunicación química y con los patrones de comportamiento relacionados con la localización de COVs de estos insectos, sobre todo con los movimientos de sus lamelas antenales (Nieves-Silva y Romero-López, 2019; Morales-Blancas y Romero-López, 2020). En dichas lamelas de se ha reportado una distribución de quimiorreceptores similar para ambos sexos de esta y otras especies de *Macrodactylus* (Romero-López *et al.*, 2017), siendo un aspecto a considerar para explicar las taxias positivas y su relación adicional con las proteínas de unión a olores (OBPs, por sus siglas en inglés) que detonan la interacción a nivel molecular con los COVs y otras

sustancias químicas en estos y otros insectos (González-González *et al.*, 2016).

Resultados parecidos con el uso de olfatómetro pueden encontrarse en dos estudios previos, también para especies de *Macroductylus*. En el primero, se utilizó un olfatómetro de acrílico portátil, de cuatro y dos vías para evaluar la respuesta de hembras y machos de *M. nigripes* hacia diferentes cebos alimentarios, incluyendo hojas de azumiate y maíz, detectando un número estadísticamente significativo de desplazamientos hacia estos estímulos foliares con respecto al control (Nieves-Silva y Romero-López, 2016).

Tipo de respuesta	%HMm	%MMm
Respuestas positivas	43 a	33 a
Desplazamientos dirigidos, pero sin contacto con el estímulo	37 a	32 a
Desplazamientos aleatorios	13 b	18 b
Desplazamientos dirigidos, pero sin contacto con el control	7 b	17 b

**Cuadro 1.** Porcentaje de respuestas positivas y desplazamientos detectados en la actividad de adultos de *Macroductylus mexicanus* hacia macerados de hojas y flores de *Acaciella angustissima*, desglosados por sexos y por tipo de respuesta en los bioensayos con olfatómetro.  $n=30$ . HMm= Hembras de *Macroductylus mexicanus*; MMm= Machos de *Macroductylus mexicanus*. Chi-cuadrada, letras distintas representan diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ) entre filas contra el control. Porcentaje total de cada respuesta suma en dirección vertical.



**Figura 7.** Respuestas positivas de adultos de *Macroductylus mexicanus* hacia el macerado hojas+flores de *Acaciella angustissima*, contra el control. Chi-cuadrada, \*Diferencias estadísticas significativas con respecto al control. n=30. MH+FAa= macerado de hojas y flores de *A. angustissima*; C= control.

En el segundo, se empleó un olfatómetro en forma de “Y”, para la evaluar la respuesta de adultos de *M. mexicanus* hacia extractos de hojas y flores de “palo dulce”, observando la presencia de respuestas positivas significativas hacia flores y hojas en comparación al control (Morales-Blancas y Romero-López, 2020). Este tipo de taxias también se han observado en otros grupos de insectos como en hembras de coleópteros de *Hypothenemus hampei* Ferrari hacia atrayentes de metanol-etanol 3:1 en olfatómetros de cuatro vías, así como en adultos hembras de himenópteros de *Prorops nasuta* Waterston hacia restos de su planta huésped en olfatómetro de dos vías (López-Rodríguez et al., 2009).

## CONCLUSIONES

1. Los registros de observación en campo permitieron detectar la secuencia general de patrones de comportamiento en la interacción *M. mexicanus* –*A. angustissima*, destacando el movimiento de antenas y el desplazamiento-posado en hojas y flores de estos coleópteros.

2. En el olfatómetro, los adultos de *M. mexicanus* mostraron una mayor frecuencia de respuestas positivas estadísticamente significativas hacia el macerado de hojas+flores de acacia con respecto al control.

3. En la interacción *M. mexicanus*-*A. angustissima* se encuentran involucrados COVs, los cuales provocan las primeras respuestas positivas de estos insectos en ambas condiciones.

## REFERENCIAS

- Acevedo, F. E. (2020). Ecología química de interacciones entre plantas, insectos y controladores naturales de plagas herbívoras. En P. Benavides Machado y C. E. Góngora (Eds.), El control natural de insectos en el ecosistema cafetero colombiano, 106–141.
- Anaya-Lang, A. L., y Espinosa-García, F. J. (2006). La química que entreteje a los seres vivos. *Ciencias*, (083).
- Arakaki, N., Wakamura, S., Yasui, H., Sadoyama, Y., and Kishita, M. (2003). Sexually differentiated functions of female-produced pheromone of

- the black *chafer* *Holotrichia loochooana loochooana* (Sawada) (Coleoptera: Scarabaeidae). *Chemoecology*, 13, 183-186.
- Arce-Pérez, R., y Morón, M.A. (2000). Taxonomía y distribución de las especies de *Macrodactylus* Latreille (Coleoptera: Melolonthidae) en México y Estados Unidos de América. *Acta Zoológica Mexicana* (nueva serie), 79, 123-239.
- Ávalos-García, A., y Pérez-Urria, E.C. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca* (Biología), Serie Fisiología Vegetal, 2(3), 119-145.
- Baldelomar, M. Lacerda-Viana, M., Telles, F.J. (2018). El rol de los compuestos orgánicos volátiles florales en las interacciones planta-insecto. *Oecología Australis*, 22(4), 348-361.
- Cantúa-Ayala, J. A., Flores Olivas, A. y Valenzuela Soto, J. H. (2019). Compuestos orgánicos volátiles de plantas inducidos por insectos: situación actual en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(3), 729-742.
- Periódico Oficial del Estado de Puebla (2014). Acuerdo del Secretario de Desarrollo Rural, Sustentabilidad y Ordenamiento Territorial por el que da a conocer el resumen del Programa de Manejo del Área Natural Protegida, con el carácter de Jurisdicción Estatal, de la zona denominada "Cerro Zapotecas", ubicada en el Municipio de San Pedro Cholula, Puebla. Periódico Oficial del Estado de Puebla, 09 de mayo. Recuperado de: [https://smadsot.puebla.gob.mx/images/Programa\\_de\\_Manejo\\_de\\_la\\_Reserva\\_Estatal\\_Cerro\\_Zapotecas\\_PUBLICADO\\_compressed.pdf](https://smadsot.puebla.gob.mx/images/Programa_de_Manejo_de_la_Reserva_Estatal_Cerro_Zapotecas_PUBLICADO_compressed.pdf)
- Flores-Hernández, J. (2011). Listado preliminar de mariposas diurnas de Cholula. *Elementos*, 83, 25-28.
- González-González, A., Palma-Millanao, R., Yáñez, O., Rojas, M., Mutis, A., Venthur, H., Quiroz, A. and Ramírez, C. (2016). Virtual screening of plant volatile compounds reveals a high affinity of *Hylamorpha elegans* (Coleoptera: Scarabaeidae) odorant-binding proteins for sesquiterpenes from its native host. *Journal of Insect Science*, 16 (1):1-15.
- Gutiérrez-Zamora, A. (2008). Las interacciones ecológicas y estructura de una comunidad altoandina de colibríes y flores en la cordillera oriental de Colombia. *Ornitología Colombiana*, 7, 17-42.

- Heath, J.J., Williams R.N., and Phelan, P.L. (2001). High light intensity: a critical factor in the wind-tunnel flight of two scarabs, the rose chafer and japanese beetle. *Journal of Chemical Ecology*, 27, 419-429.
- Leonhardt, S.D., Menzel, F., Nehring, V., and Schmitt, T. (2016). Ecology and evolution of communication in social insects. *Cell*, 164(6), 1277-1287.
- López-Ávila, A., y Rincón, D.F. (2006). Diseño de un olfatómetro de flujo de aire para medir respuestas olfativas de insectos de tamaño mediano y pequeño. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 7(1), 61-65.
- López-Rodríguez, M.A., Chiu-Alvarado, P., y Rojas, J.C. (2009). Factores que afectan la atracción de *Prorops nasuta* Waterston (Hymenoptera: Bathylidae) a los olores emitidos por los desechos de su huésped, la broca del café. *Acta Zoológica Mexicana*, 25(1), 49-60.
- López, S.N., Viscarret, M.M. y Botto, E.N. (1999). Selección de la planta hospedera y ciclo de desarrollo de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae) sobre zapatillo (*Cucurbita maxima* Duch.; Cucurbitales: Cucurbitaceae) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.; Tubiflorales: Solanaceae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 25, 21-29.
- Marín-Loaiza, J.C. y Céspedes, C.L. (2007). Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(4), 327-351.
- Martínez, A. (1996). Aceites esenciales. *Journal of Natural Products*, 59(1), 77-79.
- Martínez-Fernández, A.R., y Cordero del Campillo, M. (2002). El parasitismo y otras asociaciones biológicas. Parásitos y hospedadores. *Parasitología Veterinaria*, 2, 22-38.
- Moctezuma-Vega, B.X., y Romero-López, A.A. (2020). Patrones de comportamiento de *Macrodactylus mexicanus* (coleóptera: Melolonthidae) sobre hojas de encinos. 4to Congreso Nacional de Investigación Interdisciplinaria, México.
- Morales-Blancas, G.I. y Romero-López, A.A. (2019). Comportamiento de adultos de *Macrodactylus mexicanus* Burmeister, 1855 (Coleoptera: Melolonthidae) en su acercamiento a árboles de *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg. 1892 (Fabaceae). *Entomología mexicana*, 6, 352-357.

- Morales-Blancas, G.I. y Romero-López, A.A. (2020). Observación del comportamiento de “frailecillos” (Coleoptera: Melolonthidae) en campo y laboratorio que evidencian atracción de estos hacia flores y brotes de su planta hospedera. *Entomología mexicana*, 7, 279-285.
- Morón, M.A., Nogueira, G., Rojas-Gómez, C., y Arce-Pérez, R. (2014). Biodiversidad de Melolonthidae (Coleoptera) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 298-302.
- Nieves-Silva, E. (2019). Compuestos volátiles de *Prunus persica* (L.) para el manejo agroecológico de *Macrodactylus nigripes* (Coleoptera: Melolonthidae) (Tesis inédita de Maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. 45 p.
- Nieves-Silva, E. y Romero-López, A.A. (2016). Olfatómetro portátil para el estudio de interacciones entre “frailecillos” (Coleoptera: Melolonthidae) y sus plantas. *Entomología mexicana*, 3, 516-522.
- Nieves-Silva, E. and Romero-López, A.A. (2019). Chemical profile of the volatiles of *Baccharis salicifolia* (Astereceae) and interaction with *Macrodactylus nigripes* (Coleoptera: Melolonthidae). *Acta Agronómica*, 68(3), 222-227.
- Ninkovic, V., Markovic, D., and Rensing, M. (2021). Plant volatiles as cues and signals in plant communication. *Plant Cell Environmental*, 44, 1030-1043.
- Oliveira, L.J. and García, M.A. (2003). Flight, feeding and reproductive behavior of *Phyllophaga cuyabana* (Moser) (Coleoptera: Melolonthidae) adults. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(2), 179-186.
- Pacheco, A., Blanco-Metzler, H., y Mora, R. (2012). Modificación de olfatómetros de cuatro brazos para experimentación en broca del café, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae). *Agronomía Costarricense*, 36(1), 69-78.
- Pages-Paez, N.Y. (2021). Perfil químico de volátiles en hojas de *Acaciella angustissima* (Mill) Britton & Rose, planta hospedera de *Macrodactylus mexicanus* (Coleoptera: Melolonthidae) (Tesis inédita de Licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. 54 p.
- Reinecke, A., J. Ruther and M. Hilker. (2002). The scent of food and defense: green leaf volatiles and toluquinone as sex attractant mediate mate



- finding in the European cockchafer *Melolontha melolontha*. *Ecology Letters*, 5, 257- 263.
- Rico-Alvarado, D. y Gómez-Acevedo, S. (2022). Desarrollo floral de *Acaciella angustissima* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Acacieae). *Botanical Sciences*, 100(2), 412-422.
- Rico-Arce, M. de L. and Bachman, S. (2006). A taxonomic revision of *Acaciella* (Leguminosae, Mimosoideae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 63(2), 189–244.
- Rincón-Rosales, R. y Gutiérrez-Miceli, F.A. (2008). Características biológicas de *Acaciella angustissima* (Mill.) Britton & Rose en su hábitat natural y evaluación de su potencial cortical en Chiapas, México. *Agrociencia*, 42(1), 129-137.
- Romero-López, A.A. (2016). Comunicación química de coleópteros Melolonthidae distribuidos en México: a diez años de distancia. *Dugesiana*, 23(1), 59-73.
- Romero-López, A.A. y Arzuffi, R. (2010). Evidencias sobre la producción y liberación de compuestos bioactivos de un melolóntido mexicano. *Ecología y Control de Plagas Edafícolas*, 204-222.
- Romero-López, A.A., Benítez-Herrera, L.N., Martínez-Bonilla, O.K., Yanes-Gómez, G. and Aragón-Sánchez, M. (2017). Comparative study of distribution of antennal chemoreceptors of *Macrodactylus* of Mexico. *Southwestern Entomologist*, 42(1), 111-119.
- Ruther, J., A. Reinecke, K. Thiemann, T. Tolasch, W. Francke and M. Hilker. (2000). Mate finding in the forest cockchafer, *Melolontha hippocastani*, mediated by volatiles from plants and females. *Physiological Entomology*, 25, 172-179.
- Ruther, J., A. Reinecke T. Tolasch and M. Hilker. (2001). Make love not war: a common arthropod defense compound as sex pheromone in the forest cockchafer *Melolontha hippocastani*. *Oecología*, 128, 44-47.
- Ruther, J., A. Reinecke and M. Hilker. (2002). Plant volatiles in the sexual communication of *Melolontha hippocastani*: response towards time dependent bouquets and novel function of (Z)-3-hexen-1-ol as a sexual kairomone. *Ecological Entomology*, 27, 76-83.
- Sánchez-Cruz, A. (2019). Participación de las bacterias de la cámara genital de *Cyclocephala lunulata* (Coleoptera: Melolonthidae) en su

- comunicación química (Tesis inédita de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, México. 84p.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H. y Rocha-Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 355-363.
- Soto-Vásquez, M. R., Alvarado-García, P. A., Rosales-Cerquin, L. E., Rengifo-Penadillos, R. A. y Sagástegui-Guarniz, W. A. (2019). Composición química y efecto del aceite esencial de las hojas de *Lippia alba* (Verbenaceae) en los niveles de estrés académico de estudiantes universitarios. *Arnaldoa*, 26(1), 381-390.
- Tlapa-Almonte, M. (2005). Conservación y restauración del Cerro Zapotecas. *Elementos*, 57, 39-45.
- Yarden, G. and Shani, A. (1994). Evidence for volatile chemical attractants in the beetle *Maladera matrida* Argaman (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Chemical Ecology*, 20(10), 2673-2685.

## Capítulo 2

### **Modulación cruzada entre los neurotransmisores glicina y GABA en médula espinal y estriado dorsal de la rata**

*Erika Lorena Arroyo-Ríos<sup>1</sup>, Alexis Osvaldo Jiménez-Méndez<sup>2</sup>, Jorge Luis  
Valente Flores-Hernández<sup>1</sup> y Osvaldo Torres Ramírez<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Laboratorio de Neuromodulación, Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

<sup>2</sup>Laboratorio de Neurobiología del desarrollo, Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

\*Autor de correspondencia: [osvaldo.torresr@correo.buap.mx](mailto:osvaldo.torresr@correo.buap.mx)

#### **RESUMEN.**

Todo tipo de movimiento requiere de la activación y ejecución de comandos determinados que son regulados por estructuras específicas del sistema nervioso en los organismos complejos. En mamíferos, una de las estructuras es el núcleo estriado, la cual es considerada de mayor tamaño y la entrada del circuito de los Ganglios Basales. Se integra de núcleos intermedios como el globo pálido sección externa, núcleo subtalámico, sustancia negra parte compacta, los núcleos de salida se conforman por la sección interna del globo pálido y la sustancia negra parte reticulada, quienes reciben la información a través de la vía directa o indirecta y son responsables de integrar, analizar y seleccionar los comandos motores. La comunicación de estos circuitos se llevado a cabo a través de la célula excitable llamada neurona. La neurona principal de proyección del estriado es la espinosa mediana que representa el 98% de la población y es de tipo GABAérgica por lo que, tras su activación, ejerce un efecto principalmente inhibitorio. Existe evidencia que sugiere que dentro del núcleo estriado se encuentran receptores glicinérgicos

(GlyR's) en estas neuronas de proyección mostrando que, tras su activación participan en la regulación de la liberación de determinados neurotransmisores como la acetilcolina. La actividad natural de uno de estos receptores se ve alterada tras la activación de un segundo receptor generando una modificación en la célula. Este proceso se puede interpretar como una modulación cruzada, la cuál ha sido reportada entre los receptores de GlyR's y receptores a GABA en motoneuronas y neuronas del bulbo olfatorio donde la glicina ejerce un efecto modulador sobre las corrientes activadas por GABA. Esto también ocurre en neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado, donde se co-expresan los receptores GABAérgicos y los GlyR's y existe una modulación diferencial a lo que sucede en las motoneuronas. Por lo tanto, las respuestas neuronales no solo dependen de la liberación y la activación de receptores únicos para un determinado neurotransmisor, sino que existe una co-liberación indispensable para regular la activación de receptores y por lo tanto regular los circuitos neuronales.

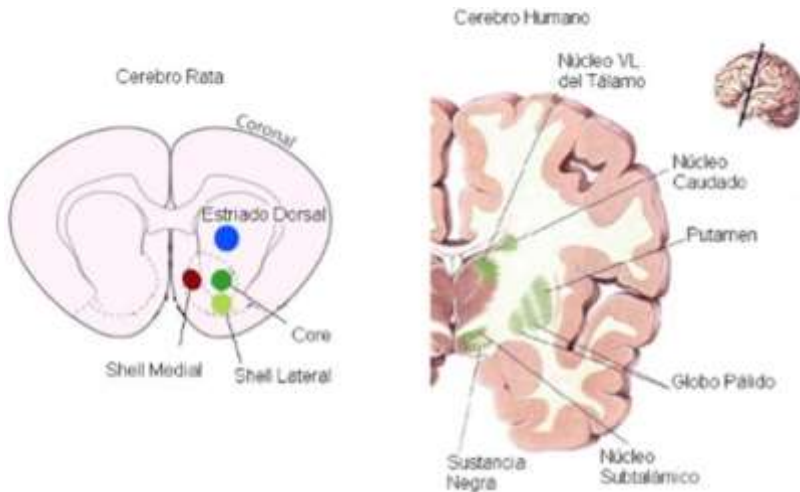
**Palabras clave:** GABA, Glicina, estriado, modulación, electrofisiología.

## **INTRODUCCIÓN.**

El movimiento es una función que todo ser vivo tiene y ejecuta con base en los estímulos del medio ambiente. Este movimiento puede ser involuntario o voluntario. El movimiento voluntario se organiza desde la corteza cerebral en donde se crean los comandos motores (corteza motora), pero las estructuras que integran y seleccionan dichos comandos motores se encuentran en los ganglios basales. La estructura de mayor tamaño es el cuerpo estriado (Str) y se considera el núcleo de entrada al circuito de los ganglios basales (GB). Esta red nerviosa está constituida por otras áreas intermedias como el núcleo subtalámico (NST), el globo pálido (GP), y la sustancia negra (SN); siendo estas dos últimas regiones cerebrales, el sitio de salida (Figura 1) (Kandel, 2000). Para el control motor, es necesario que estas estructuras reciban y envíen la información a través del tronco encefálico para que se transmita a la médula espinal, donde se ejecutan los comandos seleccionados y activan a las neuronas motoras que a su vez estimulan a las células de los músculos responsables

de generar el movimiento. Es importante conocer más a fondo las estructuras involucradas en el control motor ya que existen numerosos trastornos del movimiento como ataxia, distonía, atonía, parkinsonismo, temblores, entre otros por lo que es necesario describir estas estructuras.

Anatómicamente, el Str puede ser dividido en dos partes, el estriado *dorsal* formado por el caudado y el putamen, y el estriado *ventral*, constituido por el núcleo Accumbens (NAcc) y el tubérculo olfatorio. Las principales fibras aferentes proceden de la corteza cerebral (corticoestriadas), de la SN (nigroestriadas) y del tálamo (talamoestriadas), mientras que las principales proyecciones eferentes se dirigen al GP (estriatopalidales) y a la SN (estriatonigrales) (Escobar & Pimienta, 2019).



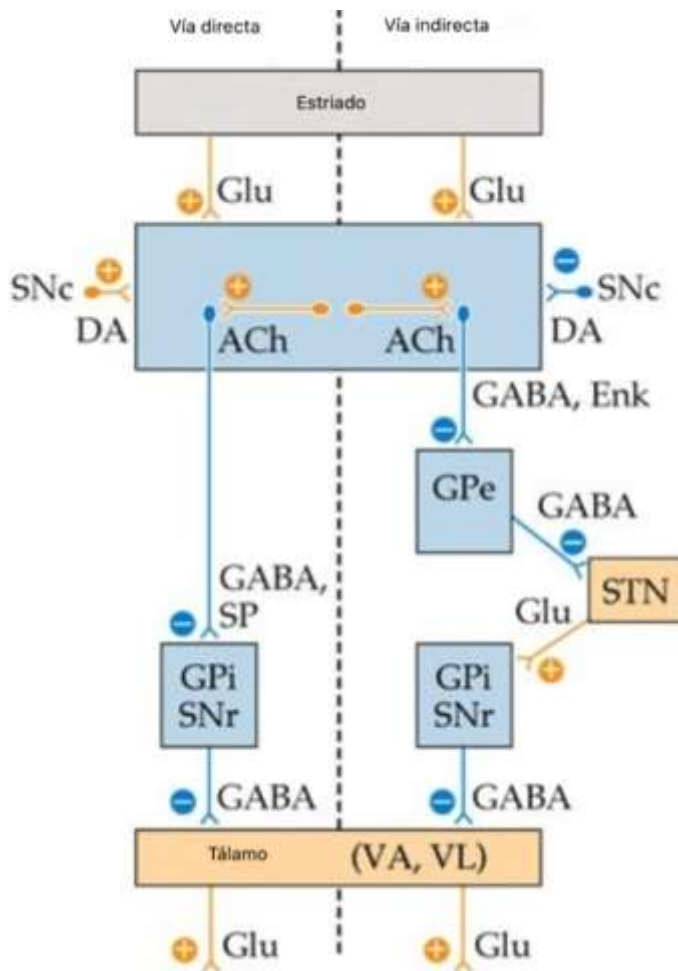
**Figura 1.** Cortes coronales de cerebro. A la izquierda se esquematiza la división del Núcleo estriado en el cerebro de la rata. A la derecha se muestran los componentes del circuito de los Ganglios Basales en un cerebro humano (Tomado de Ikemoto, 2010; Bear et al., 2001).

La región dorsal del estriado se asocia principalmente a funciones motoras y asociativas, mientras que la zona ventral se relaciona con procesos límbicos (Liljeholm y O'Doherty, 2012).

### **¿Por qué controlo mis movimientos? Modelo de los Ganglios Basales.**

Si nosotros quisiéramos ir de un lugar a otro (locomoción), quisiéramos comer, saltar o realizar una tarea que involucre la voluntad, necesitamos que nuestros ganglios basales (GB) se activen. El modelo propuesto sobre el funcionamiento de los GB y sus conexiones está asociado fundamentalmente con el control del movimiento, facilitándolo o inhibiéndolo mediante dos vías; la vía directa y la indirecta (Albin *et al.*, 1995; García, & Reid, 2010). En la vía directa, el Str inhibe al GP en su porción interna y a la SN *pars reticulata*. Estas estructuras GABAérgicas con actividad tónica, inhiben de forma continua a los núcleos talámicos, de tal manera que, la inhibición de su actividad permite la activación de los núcleos talámicos. Este proceso deriva en la activación de la corteza (motora suplementaria y motora primaria), y ésta finalmente remite la orden a las motoneuronas de la médula espinal para que se ejecute el movimiento (Figura 2) (Leisman, Melillo & Carrick, 2014; Kandel, 2000).

Por el contrario, la vía indirecta, tiende a inhibir los movimientos. El Str inhibe al GP externo (cuya acción es inhibir de forma tónica), disminuyendo la inhibición hacia el núcleo subtalámico (Glutamatérgico) el cual, a su vez excita al GP interno y a la SN *pars reticulata* (GABAérgicas) quienes a su vez inhiben al tálamo, generando una inhibición motora (Figura 2) (Purves, 2004).



**Figura 2.** Conectividad funcional de los ganglios basales para el control motor. Se muestran las vías directa e indirecta respectivamente junto con los núcleos involucrados (modificado de Leisman et al., 2013).

La población neuronal en el Str es muy heterogénea (Cuadro 1). El tipo celular más abundante, es la neurona de proyección espinosa mediana (MSN) con un ~98% de la población (Kawaguchi, Wilson, & Emson, 1990) y es de tipo GABAérgica.

Cuadro 1. Poblaciones neuronales del núcleo estriado. Modificado de Kreitzer, & Malenka, 2008

Tipo de célula	Porcentaje de Población	Conexiones	Receptores metabotrópicos	Referencias
Neurona MSN estriatonigral	49%	GPI, SNr	D <sub>1</sub> , M <sub>1</sub> , M <sub>4</sub> , mGluR 1, mGluR 5	Cepeda <i>et al</i> , 2008 Hersch <i>et al</i> , 1994 Ince <i>et al</i> , 1997 Kreitzer & Malenka, 2007
Neurona MSN estriatopalidal	49%	GPe	D <sub>2</sub> , A <sub>2A</sub> , M <sub>1</sub> , mGluR 1, mGluR 5	Cepeda <i>et al</i> , 2008 Hersch <i>et al</i> , 1994 Kreitzer & Malenka, 2007 Pollack <i>et al</i> , 1993
Interneurona de rápido disparo	0.5%	MSN	D <sub>5</sub>	Centonze <i>et al</i> , 2003, Kawaguchi, 1993
Interneurona de disparo subumbral	1.5%	MSN	D1-like	Centonze <i>et al</i> , 2002, Kawaguchi, 1993
Interneurona colinérgica	0.5%	MSN, interneurona de rápido disparo	D <sub>2</sub> , D <sub>5</sub> , M <sub>2</sub> , M <sub>4</sub>	Kawaguchi, 1993 Koos & Tepper, 2002 Wilson <i>et al</i> , 1990 Yan & Surmeier, 1996

Los porcentajes mostrados son datos experimentales en rata. **MSN**: Neurona espinosa mediana, **GPI**: Globo pálido interno, **GPe**: Globo pálido externo, **SNr**: Sustancia negra parte reticulata, **D1**: receptor a dopamina tipo 1, **D2**: receptor a dopamina tipo 2, **D5**: receptor a Dopamina tipo 5, **M1**: receptor muscarínico tipo 1, **M2**: receptor muscarínico tipo 2, **M4**: receptor muscarínico tipo 4, **mGluR 1** receptor metabotrópico de Glutamato tipo 1, **mGluR 5** receptor metabotrópico de Glutamato tipo 5.

Las neuronas tienen estructuras especializadas como el cuerpo (soma) donde se encuentra la mayor parte de los organelos, las dendritas que contiene espinas y es el principal sitio donde se lleva cabo la sinapsis, el cono axonal y el axón. Dentro de las características morfológicas de las neuronas MSN se distinguen un soma de tamaño de 15-20  $\mu\text{m}$ , troncos dendríticos de 2-3  $\mu\text{m}$  de diámetro, y poseen una gran cantidad de espinas dendríticas que cubren sus dendritas. Una forma de estimar el tamaño de las neuronas es a través de la medición de su capacitancia (la unidad de medida es el Faradio), el cual es un valor que nos dice cuanta



corriente eléctrica es capaz de almacenar la neurona (la membrana celular se comporta como un dieléctrico o aislante, lo que permite separar las cargas del medio extracelular e intracelular) y esto depende de la cantidad de membrana que posee la neurona. La capacitancia de estas neuronas se encuentra entre 2 y 10 pF en célula disociada (Kawaguchi, 1997 y 1992; Mermelstein, Becker, & Surmeier, 1996; Surmeier *et al.*, 1995).

Con base en sus proyecciones axónicas Kawaguchi *et al.*, (1990) clasificaron en subgrupos a las neuronas espinosas medianas. Tipo I: que proyectan sólo al globo pálido y co-liberan encefalinas. Tipo IIa: con proyecciones al globo pálido, núcleo entopeduncular y a la sustancia negra *pars reticulata*, estas células co-liberan encefalinas y sustancia P. Las Tipo IIb son neuronas que proyectan al globo pálido y a la sustancia negra, co-liberan encefalinas. Y finalmente las Tipo III: que proyecta a la sustancia negra co-liberando sustancia P.

Como se muestra en el cuadro 1, existe una población pequeña de interneuronas clasificadas en gigantes colinérgicas y células de tamaño mediano. Algunas de las características que definen a las neuronas gigante colinérgicas son: un soma 50-60  $\mu\text{m}$  de largo y entre 15-50  $\mu\text{m}$  de diámetro, representan menos del 1% de la población de neuronas en el estriado, en sus terminales axónicas contienen acetilcolina, y la capacitancia es mayor de 10 pF en neuronas disociadas. Por otra parte, las interneuronas de tamaño mediano se consideran lisas, ya que no presentan espinas en sus dendritas, algunas pueden presentar varicosidades (Kawaguchi, 1997 y 1992).

La forma en que estas neuronas se comunican entre sí es liberando moléculas llamadas neurotransmisores. Estos neurotransmisores ejercen sus efectos a través de proteínas (receptores específicos) que se encuentra en la membrana de las neuronas.

## **DESARROLLO.**

### **Moléculas que controlan la función motora.**

En nuestro cerebro la comunicación es importante para el desarrollo de nuestro comportamiento. Las neuronas estas continuamente enviando mensajes a través de la sinapsis, la comunicación neuronal. Una forma de sinapsis es la liberación de neurotransmisores que, como ya se mencionó

son moléculas químicas que se difunden en el espacio extracelular y actúan sobre receptores específicos que pueden encontrarse en la membrana tanto de las neuronas que lo liberan como de las neuronas que reciben el mensaje (pre-sinapsis y post-sinapsis, respectivamente). De manera general, podemos dividir la función de los neurotransmisores en dos grupos: excitadores (activan a las neuronas) e inhibidores (silencian a las neuronas). El neurotransmisor glutamato es el principal excitador y el neurotransmisor GABA, el principal inhibidor del sistema nervioso central. Las principales neuronas del control motor son de tipo GABAérgico por lo que se describe a continuación las características de este aminoácido y sus receptores.

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) se ha considerado como el neurotransmisor inhibitorio más importante en el sistema nervioso central de los mamíferos (Bowery, & Smart, 2006). Es esencial para garantizar el equilibrio entre excitación e inhibición neuronal, un requisito fundamental en la función sensitiva, cognitiva y motora, por lo que un desajuste en este sistema puede conducir a coma, presión sanguínea alterada o bien, producir diversos trastornos neurológicos y psiquiátricos, como ansiedad y depresión (Cortés-Romero *et al.*, 2011). La biosíntesis del GABA implica la formación de diversos intermediarios durante un ciclo metabólico llamado glutamato (glu)-glutamina-GABA. El precursor predominante es la glucosa, la cual es metabolizada a glutamato mediante las enzimas del ciclo de ácidos tricarbóxicos. La glutamato-deshidrogenasa (GAD) es la enzima que cataliza la conversión de Glu a GABA. La GAD requiere como cofactor al fosfato de piridoxal (derivado de la vitamina B6) (Sonnewald, & Schousboe, 2016; McKenna, 2007).

Los neurotransmisores deben estar disponibles para ser liberados cuando se estimula la neurona, por lo que una vez que el GABA es sintetizado se almacena en vesículas sinápticas mediante un transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios (VIATT, del inglés *Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter*). Tras la liberación de GABA en el espacio sináptico, el neurotransmisor debe extraerse rápidamente del medio extracelular para evitar que este no prolongue el potencial post sináptico innecesariamente y desensibilice el sistema (Purves, 2004). Este proceso en la hendidura sináptica está regulado por transportadores

específicos dependientes de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  (GAT's) (Conti, Minelli, & Meloni, 2004). Así, el GABA es recapturado por los transportadores de los astrocitos y catabolizado a succinato, intermediario que entra al ciclo de ácidos tricarboxílicos para la generación de  $\alpha$ -cetoglutarato, mismo que es metabolizado a glutamina por acción de la glutamina sintasa. La glutamina es liberada de los astrocitos y este es recapturado por las neuronas donde es convertida a glutamato por acción de la enzima glutaminasa activada por fosfato (PAG) y este a su vez es convertido a GABA e inicia nuevamente el ciclo (Figura 3).

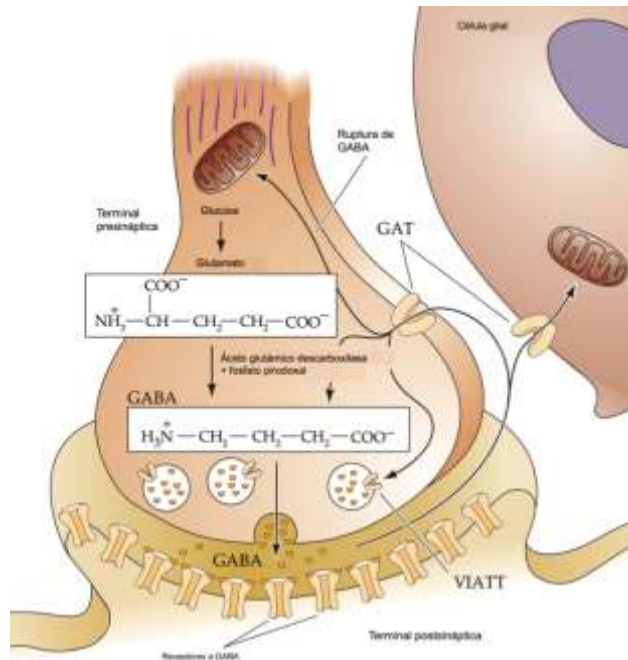


Figura 3. Síntesis GABA. Producción, liberación, acción y degradación de GABA. El esquema muestra la interacción entre la glía y las neuronas pre y postsináptica (Modificado de Purves 2004).

El GABA ejerce su acción sobre 2 diferentes receptores para provocar la inhibición sináptica. Estos receptores pueden ser divididos en 2 familias: los receptores metabotrópicos  $\text{GABA}_B$  que actúan vía

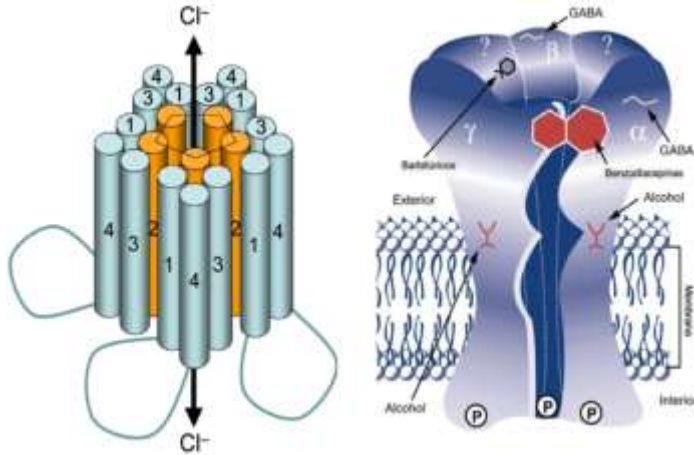
segundos mensajeros y los de tipo ionotrópico que corresponden a GABA<sub>A</sub> (Chebib, & Johnston, 1999; Perfilova, & In, 2011).

Los receptores metabotrópicos GABA<sub>B</sub> constan de 2 subunidades de siete segmentos transmembranales que activan sistemas de señalización a través de segundos mensajeros vía proteínas G (i/o), tales como la inhibición de la adenilato ciclasa, la inhibición de canales de Ca<sup>2+</sup> al parecer actuando sobre las corrientes tipo P/Q y tipo N presinápticos (Bowery *et al.*, 2002) y activación de los canales de K<sup>+</sup> postsinápticos dependientes de voltaje y rectificadores de entrada (Cheng *et al.*, 2005), por lo que se dice que producen una respuesta más lenta comparada con la de los receptores ionotrópicos, sin embargo induce señales inhibitorias más prolongadas (Chebib, & Johnston, 1999). Estos receptores son activados selectivamente por Baclofén y antagonizados por Flaclofén, Saclofén, CGP35348, entre otros (Chebib *et al.*, 1999).

Por otra parte, los receptores ionotrópicos, GABA<sub>A</sub>, son canales iónicos permeables a Cl<sup>-</sup> por lo que se dice que regulan la transmisión “rápida” (Enz *et al.*, 1995) (Figura 4). Pertenecen a la familia de canales iónicos activados por ligando (LGIC, del inglés *Ligand-Gated Ion Channels*). Estos receptores son ensamblados de una familia de 19 genes los que incluyen 16 subunidades que se pueden combinar para formar receptores GABA<sub>A</sub> y 3 subunidades  $\rho$  que contribuyen a formar los receptores GABA<sub>C</sub> (Olsen, & Sieghart, 2008). Estas subunidades poseen la misma estructura: un extremo amino terminal extracelular largo; cuatro dominios transmembranales (M1-M4), y un extremo carboxilo terminal extracelular (Johnston, 2005). El dominio M2 forma las paredes del canal (Cortés-Romero *et al.*, 2011). La región entre las subunidades M3 y M4 contiene una larga asa intracelular que participa en mecanismos reguladores como fosforilación e interacción con otros constituyentes celulares (Siegel, Albers, & Price, 2006).

El estudio de receptores nativos GABA<sub>A</sub> sugiere que las principales combinaciones entre subunidades son  $\alpha 1 \beta 2/3 \gamma 2$ ,  $\alpha 3 \beta 3 \gamma 2$ ,  $\alpha 2 \beta 3 \gamma 2$  (Cortés-Romero *et al.*, 2011) y la estequiometría más abundante en el SNC es la combinación  $\alpha 1 \beta 2 \gamma 2$ . La subunidad  $\rho$  forma parte de la estructura de los receptores GABA<sub>C</sub> y no se ha hallado evidencia de que se ensamblen con subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Cutting *et al.*, 1991).

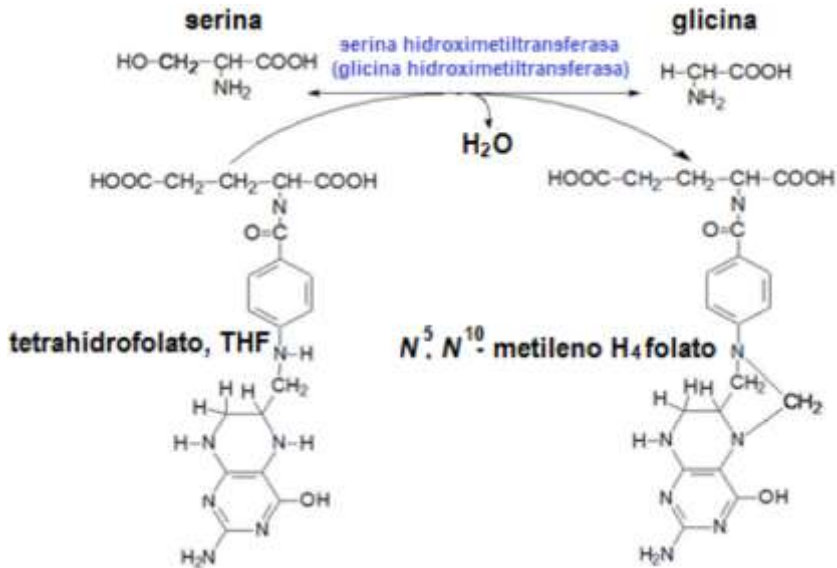
Otro neurotransmisor similar al GABA, cuyo mecanismo de acción es la apertura de canales permeables a  $\text{Cl}^-$  es la glicina (Gly). La Gly es el aminoácido más simple encontrado en todos los mamíferos (Aprison, & Werman, 1965). Su estructura molecular consta del carbono alfa con sus grupos funcionales aminoácidos y una sola cadena de un átomo de hidrógeno (Hernandes, & Tronccone, 2009).



**Figura 4.** Estructura esquemática del receptor ionotrópico de GABA, izquierda: arreglo simétrico de las 5 subunidades permitiendo la formación del canal (Modificado de Ernst et al., 2005). Derecha: Esquema del Receptor GABA<sub>A</sub> y los posibles lugares de interacción de cierto ligandos (Modificado de Mihic, & Harris, 1997).

Activamente, el neurotransmisor glicina tiene un papel dual, es coactivador del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) en las vías glutamatérgicas excitadoras y es considerado el neurotransmisor inhibitorio más importante en la médula espinal, Funcionalmente, es esencial para la regulación de movimientos voluntarios, así como el procesamiento de la información sensorial y la generación de respuestas reflejas. En el SNC, se ha involucrado con funciones auditivas y respiratorias (Saransaari, & Oja, 2009). El precursor más importante para la síntesis de Gly es el aminoácido serina, reacción catalizada por la serina

hidroximetiltransferasa (SHMT) (Siegel, Albers, & Price, 2006) (Figura 5).

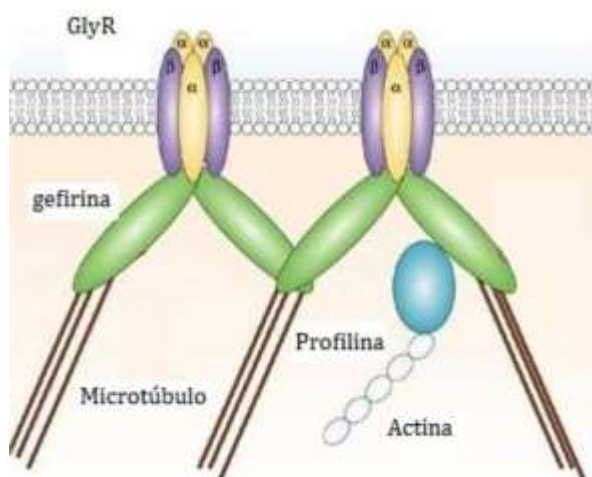


**Figura 5.** Síntesis de glicina a partir del aminoácido serina. Se muestra la acción de la serina hidroximetil transferasa (SHMT) y el cofactor Tetrahidrofolato (THF) (Tomado de Siegel, 2006).

Una vez sintetizada, la Gly se almacena en vesículas sinápticas que permitirán posteriormente la liberación de su contenido al espacio sináptico; resultando en la activación postsináptica del receptor a Gly (Betz, & Laube, 2006).

La señal inhibitoria es llevada cabo por su receptor glicinérgico (GlyR), el cuál es una glicoproteína oligomérica que forma un canal aniónico regulado por ligando, que se abre en respuesta a la unión con su agonista (Betz, 1992). Es una estructura pentamérica perteneciente a la superfamilia de receptores de neurotransmisión ionotrópica (Purves, 2004). Tras su activación, el GlyR permite el flujo de aniones al interior de la célula ocasionando una hiperpolarización, previniendo el disparo neuronal inducido por los neurotransmisores excitadores (Kirsch, 2006).

La organización del GlyR incluye 4 subunidades  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$  (Figura 6). Las subunidades  $\alpha$  son esenciales para el ensamblaje de GlyRs funcionales, en tanto que las subunidades  $\beta$  por sí mismas no generan receptores funcionales y poseen una secuencia hidrofóbica que se une a la gefirina (Kneussel, & Betz, 2000), una proteína periférica de membrana que sirve de andamiaje al interactuar con el citoesqueleto y puede influir en la sensibilidad del receptor a ciertas drogas como el sulfato de pregnenolona o análogos de picrotoxina (Gentet, & Clements, 2002). El GlyR puede tener conformación  $3\alpha:2\beta$  o bien  $2\alpha:3\beta$ .



**Figura 6.** Modelo propuesto del receptor a glicina y su anclaje por gefirina. Se observa como la gefirina une al receptor de membrana con el citoesqueleto (modificado de Choquet, 2003).

Este canal a pesar de ser activado por glicina también reconoce como agonistas a la  $\beta$ -alanina, taurina, L-alanina, L-serina y prolina; y se requieren de al menos tres moléculas del agonista para activar al receptor (Siegel, Albers, & Price, 2006; Lewis, Schofield, & McClellan, 2003).

El antagonista más potente y selectivo es el alcaloide estriquina, mismo que tiene un mecanismo de acción competitivo (Young, & Snyder 1973). La picrotoxina también bloquea parcialmente al GlyR, sin embargo, su afinidad hacia el receptor es muy baja y su disociación es

muy rápida (Sivilotti, 2010; Pribilla et al., 1992). Los GlyR son los únicos miembros de la familia de canales iónicos regulados por ligando que, hasta el momento, no poseen contraparte en la familia de receptores metabotrópicos, sin embargo, pueden ser modulados por las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas G, incrementando la afinidad por la glicina y la duración de las corrientes glicinérgicas sinápticas, por una interacción directa con la subunidad  $\alpha$  (Yevenes et al., 2003).

Estos receptores juegan un papel determinante en el procesamiento de señales motoras y sensitivas, el desarrollo neuronal y los desórdenes neurológicos hereditarios como la hiperreflexia (Maksay *et al.*, 2008); un desorden neurológico caracterizado por una respuesta exagerada a un estímulo inesperado, el cual es acompañado por rigidez muscular que resulta frecuentemente en caídas en las que el paciente no puede protegerse. La hiperreflexia es causada por mutaciones hereditarias que reducen la magnitud de las corrientes glicinérgicas (Rajendra, & Schofield, 1995).

Como se había mencionado anteriormente, la glicina también es un modulador alostérico positivo y co-agonista del receptor NMDA de glutamato (Leeson, & Iversen 1994). La forma en que la glicina actúa en el receptor de NMDA se debe a una aparente afinidad en la subunidad GluNR1 y depende del co-ensamble con la subunidad GluNR2, lo cual sugiere que existe un acople alostérico entre GluNR1 y GluNR2. (Furukawa *et al.*, 2005).

### **Interacción entre los receptores a GABA y a glicina (*Cross-Talk*).**

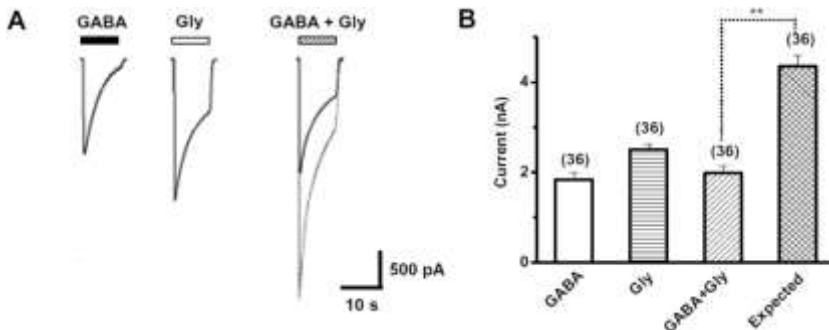
En la neurotransmisión, además de la activación selectiva de algunos receptores específicos, se lleva a cabo la activación simultánea de diferentes tipos de receptores co-localizados en la membrana postsináptica. Este efecto puede inducir una modulación de las propiedades de activación o inactivación respectivas de la proteína. Dicho proceso puede ser mediado por la interacción estructural directa o indirecta entre los receptores, considerándose un proceso adaptativo rápido para controlar la neurotransmisión.

Esta interacción se ha demostrado en diferentes tipos de receptores, entre los cuales figuran los metabotrópicos a Dopamina tipo 1 que, al



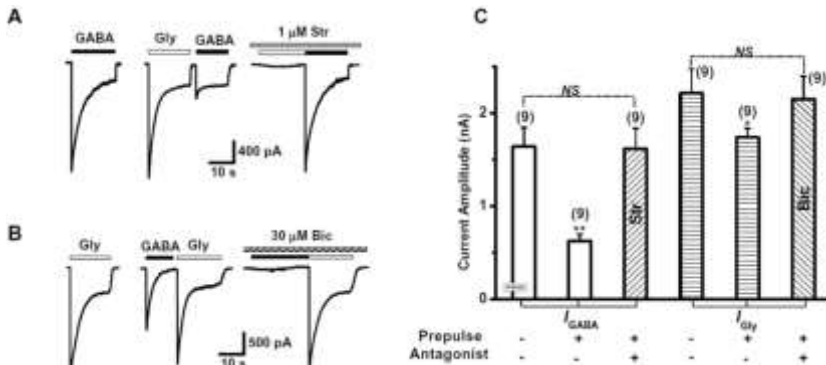
interactuar con los receptores a Adenosina A1, forman un complejo heteromérico antagonico (Ginés *et al.*, 2000); o al interactuar con los receptores NMDA puede atenuar o inhibir la actividad del canal; también se ha observado una modulación negativa entre los receptores ATP-P2X y los nicotínicos (Nakazawa, 1994). En general, la modulación cruzada entre los receptores se caracteriza por la oclusión parcial de las corrientes evocadas por el agonista, es decir, las amplitudes de las respuestas generadas por cada agonista por independiente, es mayor que la amplitud de las respuestas evocadas por co-aplicación de dos neurotransmisores (Yong *et al.*, 2003).

Al ser conocida la co-liberación de GABA y glicina de la misma terminal sináptica en médula espinal (Yong *et al.*, 2003) se sugiere una modulación cruzada entre los GABA<sub>A</sub>Rs y GlyRs, corroborándose una interacción inhibitoria de los mismos, en neuronas de la asta dorsal de la rata. Los experimentos de Yong *et al.*, (2003) en el segmento L<sub>5</sub>-L<sub>3</sub> (lumbosacro) demuestran que la respuesta a la aplicación simultánea de estos dos neurotransmisores es menor a la suma de las corrientes inducidas por la aplicación por separada de los mismos (Figura 7).



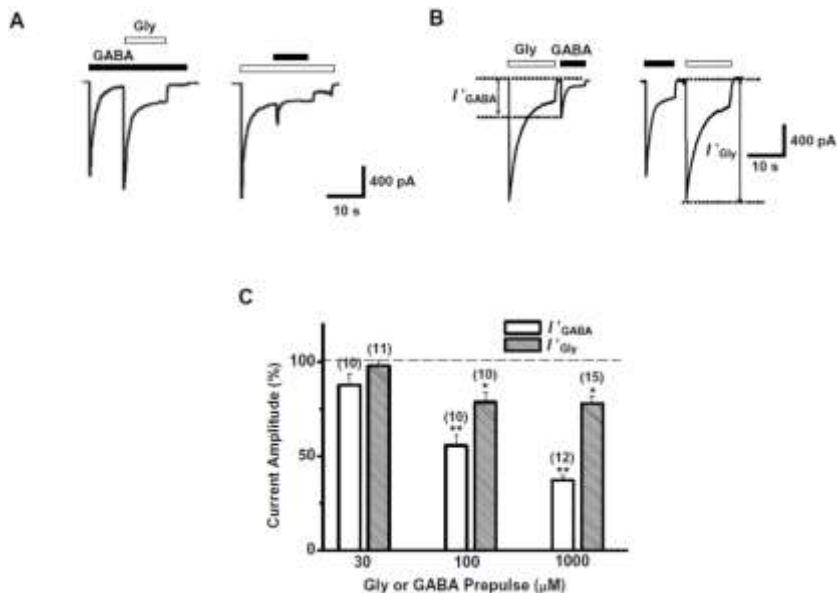
**Figura 7.** Inhibición cruzada entre la  $I_{GABA}$  y la  $I_{Gly}$ . A) Corrientes de  $Cl^-$  inducidas por la aplicación de 1 mM de GABA, 1 mM de glicina y la aplicación simultánea de éstos. Los trazos fueron obtenidos con la técnica de Patch Clamp en modalidad de célula completa en neuronas disociadas de médula espinal (El trazo en línea punteada muestra la suma de las corrientes esperada). B) La media de tamaño de la corriente medida al pico  $\pm$  ESM de 36 experimentos en neuronas de médula espinal (tomado de Yong *et al.*, 2003).

Este efecto es debido a la activación de los receptores de manera independiente, lo cual se comprobó utilizando los antagonistas competitivos de ambos neurotransmisores, es decir, para GABA se empleó bicuculina mientras que para Gly se utilizó el alcaloide estricnina observándose claramente el bloqueo de las corrientes específicas (Figura 8).



**Figura 8.** La aplicación previa de glicina disminuye la IGABA. A) Trazos de corriente generados por 1mM GABA y la aplicación secuencial de Glicina y GABA 1mM en ausencia y presencia de estricnina. 1 mM. B) Trazos de corriente generados por 1mM de Glicina y la aplicación secuencial de GABA y Glicina en ausencia y presencia de Bicuculina 30 mM. Los trazos fueron obtenidos con la técnica de Patch clamp en modalidad de célula completa. C) Análisis estadístico de los resultados de los incisos A y B en 9 células. En la gráfica izquierda se observa que la aplicación previa de glicina disminuye más del 60% la corriente de GABA con respecto a la generada en condiciones control. En la gráfica derecha se muestra que la aplicación previa de GABA tiene una disminución sobre la IGly sin embargo, dicha disminución es cerca del 30% (tomado de Yong et al., 2003).

Con el empleo de diferentes modalidades de aplicación de los agonistas para explorar la interacción entre  $I_{GABA}$  -  $I_{Gly}$  se demostró que la corriente generada por GABA es reducida de una manera más notable por la previa aplicación de Gly a la neurona (pre-pulso) que en condiciones contrarias (Figura 9) (Yong et al., 2003).



**Figura 9.** Efecto de la co-aplicación de glicina y GABA. A y B) trazos demostrativos de las corrientes generadas por la aplicación de 1mM de GABA y 1 mM de Gly con 2 diferentes modos de aplicación. C) Porcentaje de inhibición de la corriente con los protocolos mostrados en A y B a concentraciones 30, 100 y 1000  $\mu$ M de GABA y glicina según sea el caso (tomado de Yong et al., 2003).

Estos resultados sugieren una novedosa interacción entre ambos canales aniónicos mediante una vía de señalización intracelular que depende de una primera activación del receptor glicinérgico para ocluir la corriente de GABA.

Considerando todo lo anterior y dado que en el estriado, la población neuronal predominante, las neuronas espinosas medianas son GABAérgicas, entonces podría existir una modulación cruzada entre GABA y glicina similar a la que ocurre en médula espinal. En el estriado se pueden obtener, a través de técnicas enzimáticas utilizando enzimas como la Proteasa IV o la papaína (látex de la papaya, *carica papaya*), neuronas aisladas cuya observación al microscopio nos permite visualizar el soma y las dendritas proximales. Con la técnica electrofisiológica de *Patch Clamp* en célula disociada, fijación de voltaje y en célula completa

se generaron corrientes iónicas mediante la aplicación exógena de GABA. Las corrientes generadas se realizaron a un voltaje de mantenimiento de  $-40\text{mV}$  identificando previamente el potencial de equilibrio (Figura 10). Se comprobó que las corrientes generadas eran debidas a la activación del receptor  $\text{GABA}_A$  mediante la aplicación del antagonista selectivo bicuculina, el cuál redujo la corriente en más del 84%.

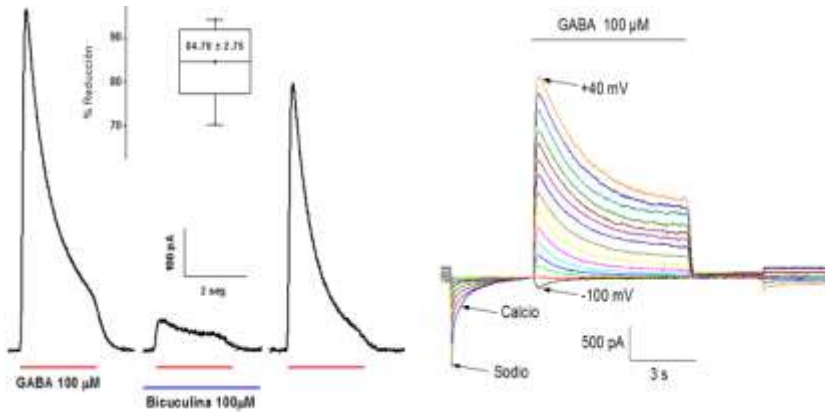


Figura 10. Corrientes generadas por la aplicación de GABA en núcleo estriado. La aplicación de GABA  $100\ \mu\text{M}$  genera corrientes GABAérgicas que fueron bloqueadas por la aplicación de bicuculina  $100\ \mu\text{M}$ . Se observa la generación de corrientes GABAérgicas a diferentes potenciales de mantenimiento (gráficas propias).

Para la generación de las corrientes de glicina se emplearon dos concentraciones  $100\ \mu\text{M}$  y  $1\ \text{mM}$ , encontrándose una corriente de mayor amplitud en la concentración de  $1\ \text{mM}$  (100% mayor con respecto a la concentración de  $100\ \mu\text{M}$ ). Se evidenció que eran evocadas por la activación del receptor glicinérgico mediante la aplicación del antagonista selectivo estrictina, el cuál redujo en 90% de manera reversible la corriente generada por la aplicación de glicina (Figura 11). Estos resultados sugieren que coexisten tanto receptores GABAérgicos como glicinérgicos en las neuronas espinosas medianas del estriado dorsal de la rata.

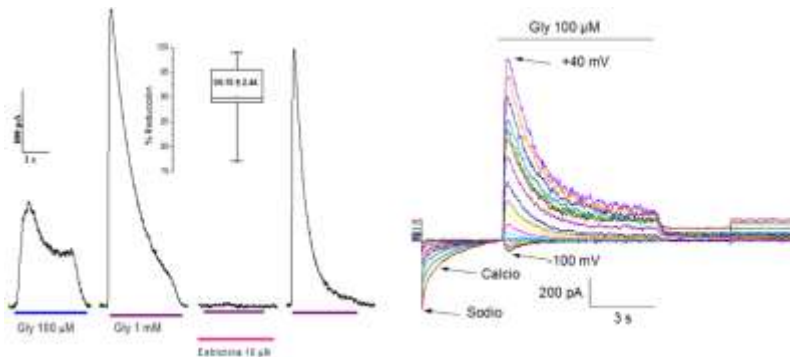


Figura 11. Corrientes generadas por la aplicación de glicina. La aplicación de  $100 \mu\text{M}$  de glicina genera una corriente menor que la concentración de  $1 \text{ mM}$ . Existe una reducción de más del 90% por la aplicación de estricina  $10 \mu\text{M}$ . Se observa la generación de corrientes glicinérgicas a diferentes potenciales de mantenimiento (gráficas propias).

Si aplicamos previamente glicina y después el GABA, se nota una reducción de la corriente GABAérgica. Lo mismo sucede si co-aplicamos o mantenemos en el baño ambos neurotransmisores (Figura 12). Estos resultados sugieren que existe una interacción entre los receptores  $\text{GABA}_A$  y los receptores glicinérgicos. Lewis y Faber en 1993 demostraron que en neuronas de médula espinal había una oclusión al co-aplicar GABA y Gly y que al aplicar picrotoxina sobre la  $I_{\text{Gly}}$ , disminuía considerablemente y desaparecía por completo al coaplicar estricina. Lo mismo ocurrió con la corriente GABAérgica, al aplicar estricina decremó en un porcentaje sin una disminución completa, hasta la aplicación de picrotoxina y bicuculina sobre la corriente. Este hecho sugiere la existencia e interacción de receptores a GABA y Gly en estas neuronas. Con estos experimentos, se comprobó que, en el estriado también ocurre la misma modulación cruzada que se observa en médula espinal.

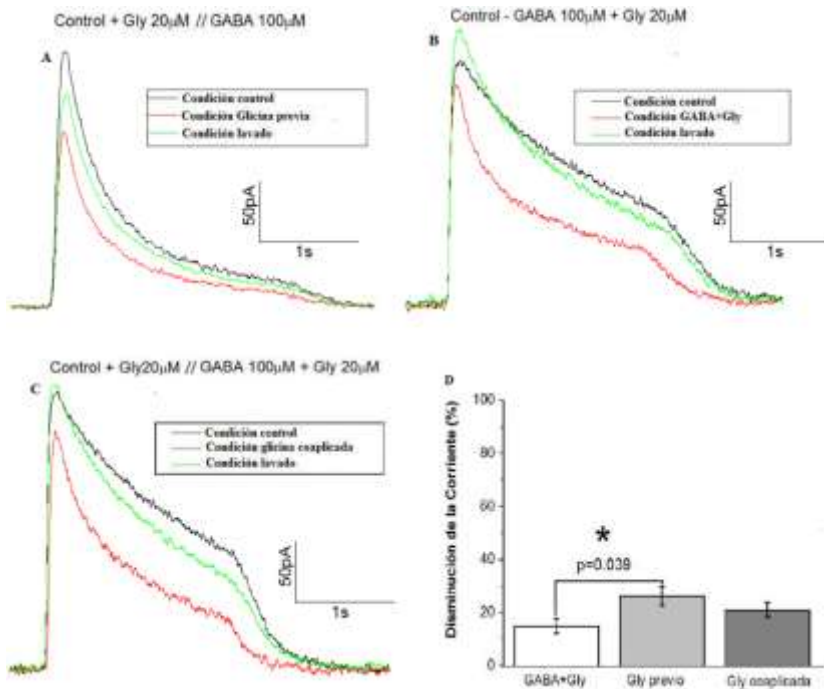


Figura 12. Efecto de glicina 20  $\mu$ M sobre la corriente activada por GABA 100 $\mu$ M. A. Glicina co-aplicado en la generación de la corriente. B. Glicina aplicada previamente a la generación de la corriente. C. Glicina co-aplicada. D. % de reducción de la corriente de GABA de los tres experimentos anteriores (gráficas propias). Se observa una mayor disminución de la corriente de GABA si glicina es aplicada previamente (ANOVA de una vía,  $p= 0.039$ ).

Trombley, Hill y Horning (1999) observaron que, en algunos experimentos realizados en neuronas del bulbo olfatorio, la inhibición se daba en un solo sentido, es decir, la Gly reduce la  $I_{GABA}$  y no viceversa. Ellos sugieren que la Gly, al ocupar el sitio de unión en el receptor, causa un cambio conformacional en la proteína llevándolo a un estado desensibilizado, y al mismo tiempo no permite que el GABA evoque la corriente. Posiblemente este efecto se deba a una interacción física entre ambos receptores (Shrivastava *et al.*, 2011; Muller, Le-Corronc, & Legendre, 2008). Este efecto inhibitorio se ha observado en diferentes

protocolos experimentales, sin embargo, el mecanismo subyacente es incierto. Otros estudios dan evidencia de que las alteraciones en el gradiente de concentración del Cl<sup>-</sup> son las responsables del efecto inhibitorio de las corrientes; al alterar la concentración del ion, y consecuentemente la fuerza electromotriz, la amplitud de la corriente posterior disminuye hasta que la concentración intracelular se recupere (Grassi, 1992). Aunado a esto, también se conoce que la activación de determinados canales iónicos incluye la activación de diferentes vías de señalización. En este aspecto, se ha elucidado que la fosforilación del GABA-R por las proteínas-cinasas aumenta la actividad del canal (Brandon *et al.*, 2000), mientras que la inducción de la desfosforilación de este receptor reduce su actividad (Lu *et al.*, 2000).

## **CONCLUSIONES.**

Yong *et al.*, en el 2003 muestran que para que la disminución de la corriente de GABA suceda, es necesaria la previa activación de los GlyR's. Ellos sugieren que, al existir una interacción entre ambos receptores, el GlyR induce un cambio conformacional en el receptor a GABA exponiendo residuos de aminoácidos serina/treoninas sensibles a fosfatasa 2B. Esto podría explicar porque la reducción significativa de nuestra corriente se nota preferentemente en una previa aplicación de Glicina. En conclusión, en el estriado, la glicina reduce la amplitud de la corriente iónica evocada por la aplicación de GABA. La modulación entre estos receptores puede tener implicaciones funcionales importantes, pues representaría un límite a una excesiva entrada de Cl<sup>-</sup> al interior neuronal, lo que implicaría una poca o nula respuesta ante estímulos vitales que requieran de una respuesta inmediata. Al mismo tiempo, este tipo de regulación puede ser de importancia en la coordinación motora y los patrones de locomoción (Jonas, Bischofberger, & Sandkühler, 1988).

Este tipo de modulación puede ocurrir con cualquier otro neurotransmisor activando sus mismos receptores o bien con la activación simultánea por dos o más neurotransmisores. Hace falta estudiar otras regiones cerebrales y sus implicaciones fisiológicas a nivel de circuito neuronal local y a nivel *in vivo*, donde se cuenta con una respuesta integral y una conducta específica ante el estímulo, para poder

identificar los comportamientos que se ejecutan por la modulación cruzada.

## REFERENCIAS

- Aprison, M., & Werman, R. (1965). The distribution of glycine in cat spinal cord and roots. *Life Sciences*, 4(21), 2075-2083. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(65\)90325-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(65)90325-5)
- Bear, M. F., Connors, B. W., Paradiso, M. A., & Mark F. Bear. (2001). *Neuroscience: Exploring the Brain*. Lippincott Williams & Wilkins pp. 473-482.
- Betz, H. (1992). Structure and function of inhibitory glycine receptors. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 25(4), 381-394. <https://doi.org/10.1017/s0033583500004340>
- Betz, H., & Laube, B. (2006). Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1600-1610. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03908.x>
- Bowery, N. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma -Aminobutyric AcidB Receptors: Structure and Function. *Pharmacological Reviews*, 54(2), 247-264. <https://doi.org/10.1124/pr.54.2.247>
- Brandon, N. J., Delmas, P., Kittler, J., McDonald, B., Sieghart, W., Brown, D., Smart, T. G., & Moss, S. J. (2000). GABAA Receptor Phosphorylation and Functional Modulation in Cortical Neurons by a Protein Kinase C-dependent Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 275(49), 38856-38862. <https://doi.org/10.1074/jbc.m004910200>
- Chebib, M., Hanrahan, J. R., Kumar, R., Mewett, K. N., Morriss, G., Wooller, S., & Johnston, G. A. (2007). (3-Aminocyclopentyl)methylphosphinic acids: Novel GABAC receptor antagonists. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.09.014>
- Chebib, M., & Johnston, G. A. (1999). THE «ABC» OF GABA RECEPTORS: A BRIEF REVIEW. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 26(11), 937-940. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.1999.03151.x>



- Choquet, D., & Triller, A. (2003). The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(4), 251-265. <https://doi.org/10.1038/nrn1077>
- Conti, F., Minelli, A., & Melone, M. (2004). GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Research Reviews*, 45(3), 196-212. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.03.003>
- Cortes-Romero, C., Galindo, F., Galicia-Isasmendi, S., & Flores, A. (2011). GABA: ¿dualidad funcional? Transición durante el neurodesarrollo. *Revista De Neurologia*. <https://doi.org/10.33588/rn.5211.2009495>
- Cutting, G. R., Lu, L., O'Hara, B. F., Kasch, L. M., Montrose-Rafizadeh, C., Donovan, D. M., Shimada, S., Antonarakis, S. E., Guggino, W. B., & Uhl, G. R. (1991). Cloning of the gamma-aminobutyric acid (GABA) rho 1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(7), 2673-2677. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.7.2673>
- Enz, R., Brandstätter, J. H., Hartveit, E., Wässle, H., & Bormann, J. (1995). Expression of GABA Receptor  $\rho 1$  and  $\rho 2$  Subunits in the Retina and Brain of the Rat. *European Journal of Neuroscience*, 7(7), 1495-1501. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb01144.x>
- Ernst, M., Bruckner, S., Boesch, S., & Sieghart, W. (2005). Comparative Models of GABA<sub>A</sub> Receptor Extracellular and Transmembrane Domains: Important Insights in Pharmacology and Function. *Molecular Pharmacology*, 68(5), 1291-1300. <https://doi.org/10.1124/mol.105.015982>
- Escobar, M., & Pimienta, H. J. (2006). *Sistema nervioso: Neuroanatomía funcional y clínica* ((2nd ed.), Vol. 2). Universidad del Valle. <https://doi.org/10.2307/j.ctv14jx7cw>
- Furukawa, H., Singh, S., Mancusso, R., & Gouaux, E. (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, 438(7065), 185-192. <https://doi.org/10.1038/nature04089>
- Gentet, L. J., & Clements, J. D. (2002). Binding site stoichiometry and the effects of phosphorylation on human  $\alpha 1$  homomeric glycine receptors. *The Journal of Physiology*, 544(1), 97-106. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.015321>

- Ginés, S., Hillion, J., Torvinen, M., Le Crom, S., Casadó, V., Canela, E. I., Rondin, S., Lew, J. Y., Watson, S., Zoli, M., Agnati, L. F., Vernier, P., Lluís, C., Ferré, S., Fuxe, K., & Franco, R. (2000). Dopamine D<sub>1</sub> and adenosine A<sub>1</sub> receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(15), 8606-8611. <https://doi.org/10.1073/pnas.150241097>
- Grassi, F. (1992). Cl<sup>-</sup>-mediated interaction between GABA and glycine currents in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Research*, *594*(1), 115-123. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91035-d](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91035-d)
- Hernandes, M. S., & Troncone, L. R. P. (2009). Glycine as a neurotransmitter in the forebrain: a short review. *Journal of Neural Transmission*, *116*(12), 1551-1560. <https://doi.org/10.1007/s00702-009-0326-6>
- Ikemoto, S. (2010). Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: A neurobiological theory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *35*(2), 129-150. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.02.001>
- Johnston, G. (2005). GABAA Receptor Channel Pharmacology. *Current Pharmaceutical Design*, *11*(15), 1867-1885. <https://doi.org/10.2174/1381612054021024>
- Jonas, P., Bischofberger, J., & Sandkühler, J. (1998). Corelease of Two Fast Neurotransmitters at a Central Synapse. *Science*, *281*(5375), 419-424. <https://doi.org/10.1126/science.281.5375.419>
- Kandel, E., Koester, J. D., Mack, S. H., & Siegelbaum, S. (2000). *Principles of Neural Science: Vol. Chapter 43 pp 853* (4th ed.). McGraw Hill / Medical.
- Kawaguchi, Y. (1992). Large aspiny cells in the matrix of the rat neostriatum in vitro: physiological identification, relation to the compartments and excitatory postsynaptic currents. *Journal of Neurophysiology*, *67*(6), 1669-1682. <https://doi.org/10.1152/jn.1992.67.6.1669>
- Kawaguchi, Y. (1996). Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neuroscience Research*, *27*(1), 1-8. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(96\)01134-0](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(96)01134-0)
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. B., & Emson, P. C. (1990). Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *The Journal of Neuroscience*, *10*(10), 3421-3438.

- Kirsch, J. (2006). Glycinergic transmission. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 535-540. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0261-x>
- Kneussel, M., & Betz, H. (2000). Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends in Neurosciences*, 23(9), 429-435. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)01627-1](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01627-1)
- Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2008). Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Neuron*, 60(4), 543-554. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.005>
- Leeson, P., & Iversen, L. L. (1994). The Glycine Site on the NMDA Receptor: Structure-Activity Relationships and Therapeutic Potential. *Journal of Medicinal Chemistry*, 37(24), 4053-4067. <https://doi.org/10.1021/jm00050a001>
- Leisman, G., Melillo, R., & Carrick, F. R. (2013). Clinical Motor and Cognitive Neurobehavioral Relationships in the Basal Ganglia. *InTech EBooks*, Chapter 1 pp 2-22. <https://doi.org/10.5772/55227>
- Lewis, T. W., Schofield, P. R., & McClellan, A. M. L. (2003). Kinetic Determinants of Agonist Action at the Recombinant Human Glycine Receptor. *The Journal of Physiology*, 549(2), 361-374. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.037796>
- Liljeholm, M., & O'Doherty, J. V. (2012). Contributions of the striatum to learning, motivation, and performance: an associative account. *Trends in Cognitive Sciences*, 16(9), 467-475. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2012.07.007>
- Maksay, G., Nemes, P., Vincze, Z., & Bíró, T. (2008). Synthesis of (nor)tropine (di)esters and allosteric modulation of glycine receptor binding. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(4), 2086-2092. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.10.097>
- McKenna, M. C. (2007). The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: Fates of glutamate in brain. *Journal of Neuroscience Research*, 85(15), 3347-3358. <https://doi.org/10.1002/jnr.21444>
- Mermelstein, P., Becker, J. B., & Surmeier, D. J. (1996). Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *The Journal of Neuroscience*, 16(2), 595-604. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-02-00595.1996>

- Mihic, S. J., S. J., & Harris, R. A. (1997). GABA and the GABAA receptor. *Alcohol Health and Research World*, 21(2), 127-131. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6826832/>
- Muller, E. E. L., Le-Corronc, H., & Legendre, P. (2008). Extrasynaptic and postsynaptic receptors in glycinergic and GABAergic neurotransmission: a division of labor? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 1. <https://doi.org/10.3389/neuro.02.003.2008>
- Nakazawa, K. (1994). ATP-activated current and its interaction with acetylcholine-activated current in rat sympathetic neurons. *The Journal of Neuroscience*, 14(2), 740-750. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-02-00740.1994>
- Olsen, R. W., & Sieghart, W. (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid<sub>A</sub>Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. Update. *Pharmacological Reviews*, 60(3), 243-260. <https://doi.org/10.1124/pr.108.00505>
- Perfilova, V. N., & In, T. (2010). [GABAC receptors: structure and functions]. *Ekspierimental'naia i klinicheskaia farmakologija*, 74(1), 45-49.
- Pribilla, I., Takagi, T., Langosch, D., Bormann, J., & Betz, H. (1992). The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *The EMBO Journal*, 11(12), 4305-4311. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05529.x>
- Purves, D. (2004). *Neurociencia* (3ª edición). Panamericana pp. 426-427.
- Rajendra, S., & Schofield, P. R. (1995). Molecular mechanisms of inherited startle syndromes. *Trends in Neurosciences*, 18(2), 80-82. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)80028-z](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)80028-z)
- Saransaari, P., & Oja, S. S. (2009). Mechanisms of Glycine Release in Mouse Brain Stem Slices. *Neurochemical Research*, 34(2), 286-294. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9774-x>
- Shrivastava, A. N., Triller, A., Sieghart, W., & Sarto-Jackson, I. (2011). Regulation of GABAA Receptor Dynamics by Interaction with Purinergic P2X2 Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 286(16), 14455-14468. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.165282>

- Siegel, G., MD, Albers, R. W., & Price, D. L. (2006). *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology* (seven edition p.p. 291-300). Elsevier Inc. All rights reserved.
- Sivilotti, L. G. (2009). What single-channel analysis tells us of the activation mechanism of ligand-gated channels: the case of the glycine receptor. *The Journal of Physiology*, 588(1), 45-58. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.178525>
- Sonnewald, U., & Schousboe, A. (2015). Introduction to the Glutamate–Glutamine Cycle. *Advances in neurobiology*, 1-7. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45096-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45096-4_1)
- Sun, Y., Wu, C. S., Renger, J. J., Uebele, V. N., Lu, H., & Beierlein, M. (2012). GABAergic Synaptic Transmission Triggers Action Potentials in Thalamic Reticular Nucleus Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 32(23), 7782-7790. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0839-12.2012>
- Surmeier, D., Bargas, J., Hemmings, H. C., Nairn, A. C., & Greengard, P. (1995). Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron*, 14(2), 385-397. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90294-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90294-5)
- Trombley, P. Q., Hill, B. J., & Horning, M. S. (1999). Interactions Between GABA and Glycine at Inhibitory Amino Acid Receptors on Rat Olfactory Bulb Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 82(6), 3417-3422. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.6.3417>
- Xu T. (2007). Molecular pain. Chapter 13 Inhibitory transmission. Springer, Higher education Press. 157-68.
- Yevenes, G. E., Peoples, R. W., Tapia, J. C., Parodi, J., Soto, X., Olate, J., & Aguayo, L. G. (2003). Modulation of glycine-activated ion channel function by G-protein  $\beta$  subunits. *Nature Neuroscience*, 6(8), 819-824. <https://doi.org/10.1038/nn1095>
- Yong, L., Wu, L. J., Legendre, P., & Xu, T. (2003). Asymmetric Cross-inhibition between GABAA and Glycine Receptors in Rat Spinal Dorsal Horn Neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38637-38645. <https://doi.org/10.1074/jbc.m303735200>
- Young, A. B., & Snyder, S. H. (1973). Strychnine Binding Associated with Glycine Receptors of the Central Nervous System. *Proceedings of the*

*National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(10),  
2832-2836. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.10.2832>

## Capítulo 3

### Modo de acción del beta agonista adrenérgico- clenbuterol- $\beta_2$ AA-Clb, en bovinos

*Ricardo Enrique Caicedo Rivas<sup>1</sup>, Mariana Paz-Calderón Nieto,<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Laboratorio de Endocrinología de la Reproducción y Malacología- LERyM, Facultad de Ciencias Biológicas.

<sup>2</sup>Complejo Regional Centro, Amozoc, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla-México.

\*Autor de correspondencia: [ricaido@yahoo.com](mailto:ricaido@yahoo.com), [ricardo.caicedo@correo.buap.mx](mailto:ricardo.caicedo@correo.buap.mx)

#### ABSTRACT

Clenbuterol considered as a powerful broncho-vase-dilator, used to control respiratory diseases, both in animals and in humans; Clb is a  $\beta_2$ -adrenergic agonist ( $\beta_2$ -AA), which causes an increase in muscle mass in birds, pigs, cattle and sheep, however, the metabolic routes to date are not well elucidated; The objective of this study was to determine the metabolites that arise with the intake of clenbuterol and its possible derivatives that are stored in the liver, pancreas, adrenal gland, muscles and genital organs, mainly in cattle. Fat content is dramatically reduced when clenbuterol is used as an anabolic, meaning anabolic, when Clb is administered orally or intramuscularly above the therapeutic dose, between 5 and 10 times its therapeutic concentration (0.8 $\mu$ g/body weight). twice daily). For this study, 17 different metabolites were measured to determine which metabolic parameters are disturbed, preventing homeostasis at the level of the different organs in which it intervenes. The study showed that there are several metabolites that are altered by clenbuterol, among these we have: glucose, triglycerides, alkaline phosphatase, gamma glutamyl transferase, transaminases (ALT/GPT y AST/GOT), lactic dehydrogenase, prostatic and non-

prostatic acid phosphatase, cholesterol, and calcium. This indicates that it has an effect on altering the metabolism of several metabolic pathways, contributing to its lipolytic and antilipogenic activity and induces nitrogen retention, increases glycolysis, lactate production and oxygen consumption, increases levels of glucose, which varies according to the time of treatment, since at the level of the pancreas insulin decreases and adipocytes are less sensitive to this hormone, there is an increase in the use of energy, bringing with it an increase in body temperature-thermogenesis.

**Keywords:** Bioavailability, biotransformation, metabolic profile, metabolic pathways,  $\beta$ -adrenergic agonist ( $\beta$ AA)

## RESUMEN

El clenbuterol considerado como un potente bronco-vasodilatador, utilizado para controlar enfermedades respiratorias, tanto en animales como en humanos; el Clb es un  $\beta_2$ -agonista-adrenérgico ( $\beta_2$ -AA), el cual, causa incremento de la masa muscular en Aves, cerdos bovinos y ovejas, sin embargo, las rutas metabólicas hasta el presente no están bien dilucidadas; el objetivo de este estudio consistió en determinar los metabolitos que surgen con la ingesta del clenbuterol y sus posibles derivados que se almacenan en la estructura hepática, páncreas, glándula suprarrenal, músculos y órganos genitales principalmente en bovinos. El contenido de grasa es reducido dramáticamente cuando el clenbuterol es utilizado como anabólico, entendiéndose como anabólico, cuando el Clb se administra de forma oral o intramuscular por arriba de la dosis terapéutica, entre 5 y 10 veces su concentración terapéutica (0.8 $\mu$ g/peso corporal dos veces al día). Para este estudio se midieron 17 metabolitos diferentes con el propósito de determinar cuáles son los parámetros metabólicos que son perturbados, impidiendo la homeostasis a nivel de los diferentes órganos en el que interviene. El estudio manifestó que son varios los metabolitos que son alterados por el clenbuterol entre estos tenemos a: a la glucosa, triglicéridos, fosfatasa alcalina, Gamma Glutamil Transferasa, transaminasas (ALT/GPT y AST/GOT), Deshidrogenas Láctica, Fosfatasa Ácida Prostática y no Prostática, colesterol y calcio. Esto indica que tiene un efecto en alterar el metabolismo de varias y rutas



metabólicas, contribuyendo a que posee actividad lipolítica, y antilipogénicas e induce a la retención de nitrógeno, aumenta la glicolisis, la producción de lactato y el consumo de oxígeno, incrementa, los niveles de glucosa, que varía de acuerdo al tiempo de tratamiento, ya que a nivel del páncreas disminuye la insulina y los adipocitos son menos sensibles a esta hormona, hay incremento en la utilización de energía, trayendo consigo el aumento de la temperatura corporal-termogénesis.

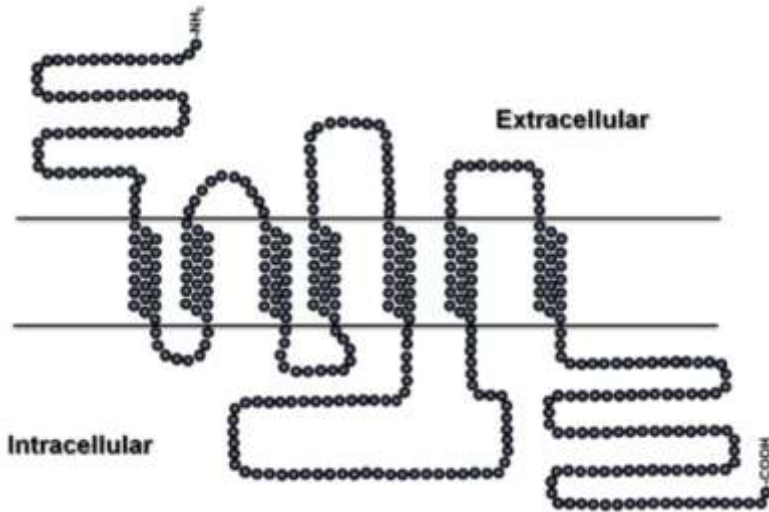
**Palabras claves:** Biodisponibilidad, Biotransformación, perfil metabólico, rutas metabólicas,  $\beta_2$ -agonista adrenérgico ( $\beta$ AA)

## INTRODUCCIÓN

La utilización de  $\beta_2$ -agonistas principalmente el clenbuterol (Clb), zilpaterol y la ractopamina, están produciendo un incremento en las intoxicaciones en humanos y animales, principalmente por el uso desmedido de estos componentes que son utilizados como aditivos alimenticios (Sumano *et al.*, 2002, Caicedo *et al.*, 2009, 2011, Valladares *et al.*, 2013 y Caicedo *et al.*, 2021). Por otro lado, también se han desarrollado otros componentes que mejoran la calidad corporal de los animales como: antibióticos, prebióticos, enzimas, antimicrobianos, modificadores del sistema inmunitario, modificadores metabólicos o agentes anabolizantes. En los últimos años, se ha incrementado el uso de los  $\beta_2$ -agonista-adrenérgicos ( $\beta_2$ -AA) en animales de importancia económica; considerar que el uso excesivo de este fármaco como el clenbuterol (Clb) han tenido y sigue teniendo un impacto toxico muy significativo a nivel humano y animal (alterando el bienestar animal y humano, respectivamente). Su utilización aumenta la producción de carne a corto plazo, en tres meses se puede aumentar el peso vivo del animal en un 50-80%, esto dependerá de la concentración de Clb que se le suministre al animal, al igual que el tiempo de administración (Caicedo *et al.*, 2021), ya que el Clb tiende a retener compuestos nitrogenados, incrementado la masa muscular (Smith, 1998). Los agonistas de  $\beta_2$ AA aumentan el metabolismo degradativo de los lípidos en los adipocitos *in vitro* e *in vivo*. En los tejidos de los mamíferos, existen hasta el momento tres subtipos distintos de receptores- $\beta$ AR de los  $\beta_2$ AA, como:  $\beta_1$  ( $\beta$ 1AR),

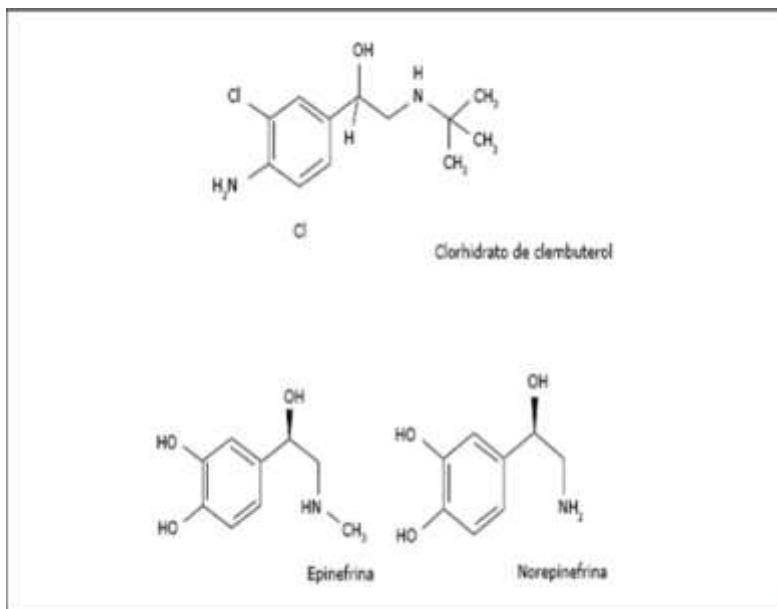
$\beta_2$  ( $\beta_2$ AR) y  $\beta_3$  ( $\beta_3$ AR). Los tejidos individuales (ejemplo: hígado, corazón) tienen diferentes proporciones de subtipos, esto dependerá de la especie de vertebrados, y que varía entre diferentes especies. Consecuentemente, se espera que ciertos agonistas de  $\beta_2$ AA tengan efectos diferentes en el mismo tejido en diferentes especies debido a las diferencias en la distribución de los subtipos de  $\beta$ AR y (o) secuencia de aminoácidos (Mersmann, 2002); por tal motivo, se puede agregar que los efectos producidos por un agonista (o antagonista) de  $\beta$ AR en el tejido adiposo *in vivo* dependen no solo de la especie y la distribución de los subtipos de  $\beta$ AR del adipocito, sino también de la farmacocinética y farmacodinámica del compuesto en esa especie, incluido el flujo sanguíneo al tejido, y los múltiples efectos metabólicos y endocrinos del compuesto en otros tejidos del cuerpo (Mersmann, 2002).

Estos fármacos  $\beta_2$ -AA, son además agentes químicos que actúan específicamente a nivel de los receptores adrenérgicos celulares ( $\beta$ -AR), metabolizando los nutrientes e incrementan la energía, aumentan el metabolismo de las proteínas y de grasas, modifican la permeabilidad de la membrana celular, aumento de la lipólisis, y la glucogenólisis (Meyer y Rinke, 1991), debido a la ubicación de sus receptores (dominios hidrofóbicos transmembranales) en la membrana celular en donde actúan (Figura 1).



**Figura 1:** Todos los receptores  $\beta$ -AR contienen siete dominios hidrofóbicos transmembranales que permite que este componente como el Clb, su efecto sea mucho más prolongado principalmente en los adipocitos. Según Johnson et al., 2014, (Asian Australasian J. Anim. Sci., Vol.27, No. 5: 757-766)

Además, traen consigo un incremento en la formación de masa muscular, y esto debido a que el grupo OH que poseen otros  $\beta_2$ -AA, en el caso del Clb, es sustituido por un halógeno llamado cloro (Cl), este ion Cl evita la biotransformación por las enzimas COMT (catecol-O-metiltransferasa) a nivel tisular y se hace lenta la biotransformación hepática (Courtheyn *et al.*, 1996), este ion cloro en el clenbuterol, lo hace más liposoluble que sus análogos (zilpaterol, salbutamol y ractopamina) y como resultado tiende a difundirse más profundamente en los tejidos y en la grasa animal (Martin 1971, Ruffolo, 1991, Waldeck y Widmark, 1995) (Figura 2).



**Figura 2:** Comparación de la estructura química de tres componentes llamados fenetanolaminas dos producidos fisiológicamente producidos por el organismo: la Epinefrina y Norepinefrina y un componente sintético llamado clenbuterol, este se caracteriza por tener dos átomos de cloro-Cl en su estructura, el cual, le da una acción prolongada. (Tomado de Valladares et al., 2015).

La aplicación de  $\beta_2$ -AA a mamíferos, amplifica una ganancia de peso, esto posiblemente se deba al aumento de la cantidad de ARNt (ácido ribonucleico de transferencia) para varias proteínas del músculo esquelético, en este caso, después del tratamiento con  $\beta_2$ -AA se incrementa el ARNm para la miosina de cadena ligera (Smith *et al.*, 1998), el ARNm de la  $\alpha$ -actina (Helferich *et al.*, 1990) y el inhibidor de la proteasa calpaina-calpastina (Higgins *et al.*, 1988). Los  $\beta_2$ -AA, pueden incrementar el flujo sanguíneo en ciertas regiones del cuerpo, el mismo permite el proceso de hipertrofia del músculo esquelético al contener mayores cantidades de sustrato y fuentes de energía para la síntesis de proteína. Teóricamente la utilización de estas sustancias presenta una serie de ventajas relacionadas, no solo con la mejora de la productividad,

sino también de la calidad de la carne, puesto que las carnes procedentes de animales tratados con  $\beta_2$ -AA presentan un mayor porcentaje de tejido magro (Beermann, 1993; Waldeck y Widmark 1995 y Mersmann, 1998). Sin embargo, el aumento del uso de  $\beta_2$ -AA está relacionado con el incremento de intoxicaciones en humanos, según Kuri, *et al* (2007); se considera como dosis terapéutica (DT) 0.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal dos veces por día. La duración máxima del tratamiento en ganado no lactante permitido es de 10 días por vía oral o intravenosa. El uso ilegal del Clb y análogos en el ganado, es toda dosis que supere la dosis terapéutica (Sauer *et al*, 1995). En base a lo anterior se muestra que hasta el momento se desconoce las rutas metabólicas (biotransformación y biodisponibilidad) de degradación de este aditivo alimenticio, por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar las posibles rutas metabólicas del Clb en bovinos y su efecto en el deterioro homeostático del animal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Animales:** Se utilizaron 2687 bovinos (*Bos taurus* X *Bos indicus*), el 85 % fueron machos y 15% hembras, procedente de diferentes zonas zoogeográficas del país y de diferentes rastros municipales como de fincas privadas. Todas las fincas en estudio fueron georreferenciadas con un GPS. Las edades de los animales fluctuaron desde los 22-38 meses, las razas predominantes: razas cruzadas: Angus X Brahman=Brangus, Brahman-cebú, Gir, Simmental, Angus, Cebú, Holstein, Charoláis y criollos.

**Toma de muestras:** Se emplearon tubos de ensayo al vacío, el primer tubo sin anticoagulante, para obtener el suero sanguíneo para la determinación del perfil metabólico y perfil hormonal de esteroides principalmente (progesterona y  $17\beta$ -estradiol) y otro tubo con EDTA, para la realización de frotis sanguíneos y así determinar la biometría hemática (el recuento diferencial de leucocitos y medición de hemoglobina). La sangre sin EDTA fue centrifugada a 2,500 rpm/10min, el suero obtenido se separó en tubos eppendorf y fueron congelados a  $-20^\circ\text{C}$  para su posterior análisis de metabolitos sanguíneos, se utilizaron kit-Bio-System-USA y se midieron 18 metabolitos tales como:

macrominerales: calcio, fosforo, enzimas hepáticas: Gamma-glutamyl transferasa ( $\gamma$ GT), deshidrogenasa láctica (L-DH), Fosfatasa alcalina (FA); transaminasas como: alanina amino-transferasa (ALT/GPT) y aspartato amino-transferasa (AST/GOT), metabolitos como: albumina, Bilirrubina directa y total, colesterol total, Glucosa, proteínas totales, Urea/BUN, enzimas prostáticas: fosfatasa ácida total (FAT), no prostática y prostática; las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro (Spectronic 20). Para la determinación del clenbuterol se utilizó el *kit RIDASCREEN*, Clenbuterol Fast (*R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany*), para medir las concentraciones de esteroides: progesterona ( $P_4$ ) y  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), se utilizó la técnica de inmunodiagnóstico de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), se utilizaron los *kits diagnostica*, USA, se midieron en un lector de ELISA (Stat Fax-2100, Microplate Reader).

**Análisis Estadístico:** los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANOVA), con el programa estadístico Stat-2 (Olivares 1984) y para determinar la significancia entre promedios se utilizó *Duncan New Multiple Range Test*.

## RESULTADOS

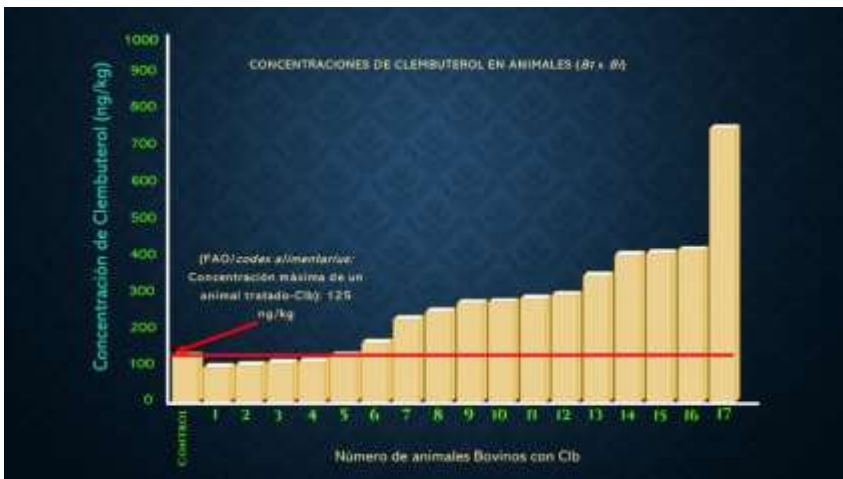
### 1. Efecto de las concentraciones administradas en bovinos con Clb

Los resultados muestraron que el Clb, ( $\beta_2$ -AA) altera el crecimiento y la composición del músculo, al parecer, decrecer el incremento del musculo cuando la lipogénesis decrece, estimula la lipólisis; el incremento de la masa muscular, el cual, está asociado con la proliferación de células satélites, estimulando las miofibrillas en la síntesis de proteínas y la supresión de la degradación de miofibrillas en la degradación de proteínas. Los animales muestrados incrementaron su peso corporal entre un 50 a 70 % de su peso inicial, en un tiempo de 90 a 112 días de tratamiento, la alimentación diaria con Clb fue de dos veces

al día, a concentración entre 5 a 10 veces la dosis terapéutica (0.8µg/Kg- peso corporal), ósea a dosis anabólica.

Un primer muestreo de animales bovinos llevados a rastro con un peso de sacrificio entre 457±21.6 a 672.8±39.9 kg, en un periodo de tratamiento entre 75.8±8.9 días a 121.7±11.3 días y con edades que fluctuaron entre los 25±1.0 a 38.9±2.2 meses, en la figura 3 se muestran las concentraciones de Clb detectadas en estos animales ya listo para su distribución y venta, las concentraciones de Clb fluctuaron entre 112.4±5.9 a 778±12.5 ng/kg (Figura 3).

**Figura 3.** Se muestran las concentraciones de Clb de 17 bovinos en un rastro, donde la mayoría de los animales se detectaron con concentraciones de Clb por arriba de los permitidos por el Codex alimentarius-FAO (125ng/kg), la línea roja indica la concentración máxima permitida para consumo humano.



Un segundo muestreo realizado 12 meses después del primero, se detectaron concentraciones de Clb en tejido sanguíneo estos fluctuaron entre los 245±34.5 a 1623±146.6 ng/kg, si se analizan estos valores corresponde a animales bovinos listos para ser distribuidos en los diferentes supermercados para ser consumidos por el hombre, sin embargo, estos valores no coinciden con los valores aceptados por la FAO/OMS-(Codex Alimentarius), cuyos valores no deben rebasar a los

125.0 ng/kg, si el animal ha sido tratado con Clb, y supera este valor, entonces deberá someterse a periodo de cuarentena, para que estos valores presente en sangre bajen a través de su degradación a nivel sanguíneo y hepático, sin embargo, las altas concentraciones del Clb detectados en este estudios han coincidido con casos de intoxicaciones en humanos por la ingesta de vísceras de bovinos que es donde más se concentra este  $\beta_2$ -AA-Clb en bovinos, existen casos de intoxicaciones de Clb en humanos desde el año 2002 al año 2022, con más de 4500 casos a nivel nacional, por ejemplo en México.

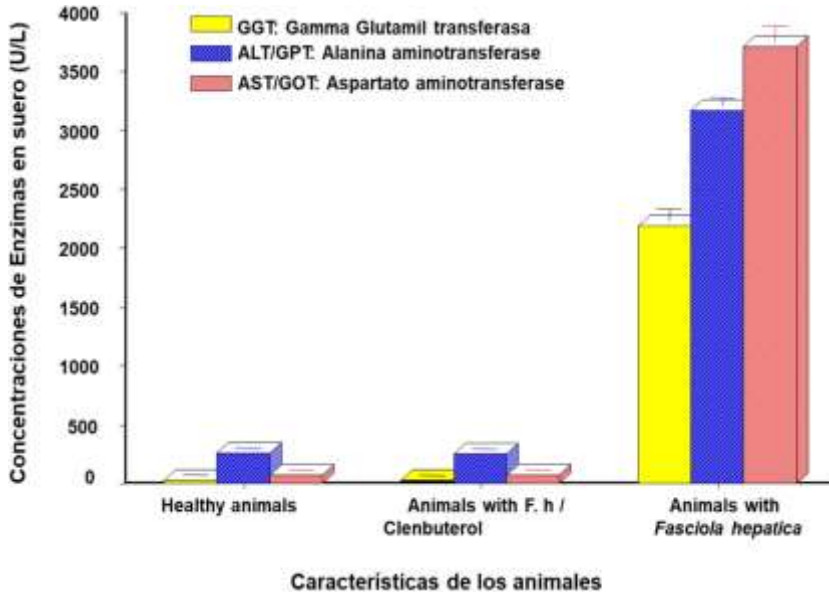
## 2. Efectos del Clb al Perfil Metabólico:

Se recalca que existen muy pocos trabajos o casi ningún tipo de información del efecto del Clb los diferentes metabolitos y enzimas a nivel del suero sanguíneo de los animales bovinos destinados al consumo humano, sin embargo, este estudio realizo la medición de los varios metabolitos, el cual, fueron detectados y en la cual mostramos a continuación:

En cuanto al perfil metabólico se obtuvieron concentraciones elevadas de las enzimas transaminasas: la AST/GOT se tuvieron valores de animales clínicamente sanos (ACS) de  $533.9 \pm 0.26$  U/L en comparación con animales tratados con Clb, cuyo valor detectado fue de  $264.7 \pm 0.22$  U/L, hubo un descenso significativo  $p < 0.01$ , el cual, indica que hay un enorme cambio fisiológico a nivel hepático, a nivel del parénquima hepático, posiblemente degradación del parénquima hepático sin destrucción de tejido, ya que estas enzimas son intracelulares, lo mismo ocurrió con la ALT/GPT, cuyo valor en animales no tratados con Clb fue de  $345.5 \pm 0.60$  U/L en comparación con bovinos tratados con Clb se detectó valores de  $277.9 \pm 0.50$  U/L, hay también una disminución significativa de  $p < 0,05$ ; por otro lado, la enzima hepática la Gamma-glutamil transferasa ( $\gamma$ GT), se detectó valores significativamente muy bajos ( $p < 0.01$ ) con referente a los animales ACS, entre  $16.7 \pm 0.34$  y  $26.5 \pm 0.30$  U/L, respectivamente, el Clb también es capaz de disfrazar ciertas patológicas hepáticas trabajo ya presentado en el 2011 (Figura 4), estos animales presentaron muchas patologías hepáticas como: quistes,



obstrucción de canalículos hepáticos y probablemente renal y aunque no se haya determinado para este caso muy particular a la fosfatasa alcalina (FA).

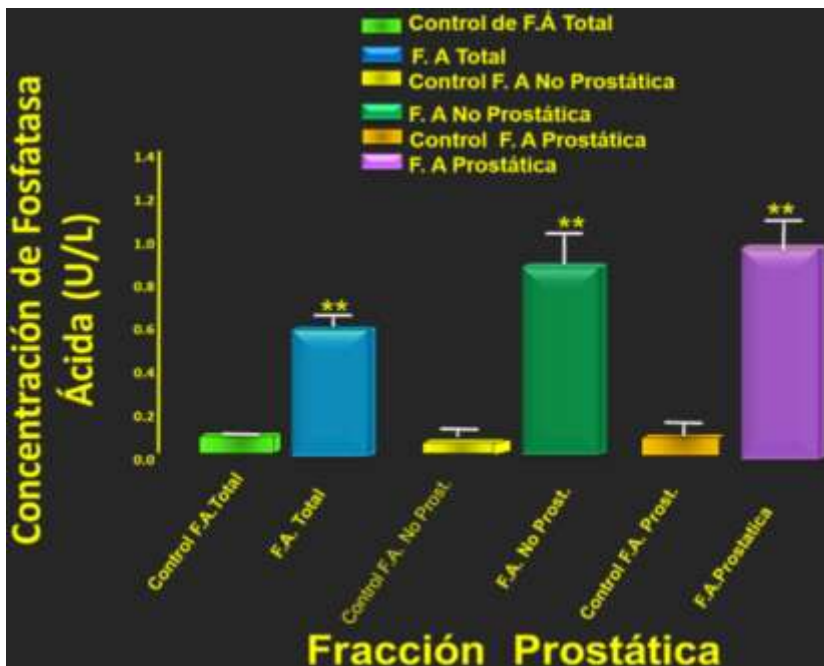


*Figura 4: Se muestra como el Clb disfraza las enfermedades hepáticas en bovinos, donde los valores de animales con Fasciola hepatica más Clb tienen valores enzimáticos muy similares a los animales clínicamente sanos, mientras que los animales con Fasciola hepatica si muestran daños hepáticos- fibrosis hepática-cirrosis, por los valores enzimáticos muy elevados en comparación con los otros grupos experimentales.*

Otros metabolitos como la glucosa sus valores detectados fueron para ACS  $115.8 \pm 0.31$  mg/dL y en animales tratados tuvieron valores de  $195.4 \pm 0.34$  mg/dL son bajo, debido a la alta demanda metabólica que este Clb exige a las diferentes estructuras incluyendo al hígado, páncreas, glándulas tiroides y glándulas suprarrenales, ya que, inicialmente este parámetros metabólicos es muy elevado, al transcurrir las horas y días después de la ingesta de este aditivo alimenticio esta actividad disminuye,

pero ciertos componentes procedentes de la degradación del Clb se acumulan incluyendo parte del Clb ingerido y que no llega degradarse en su totalidad, indicando que la biodisponibilidad de este es lo suficiente útil para seguir acumulándose en tejidos y continuar con la degradación de los lípidos, con acumulación de nitrógenos, a través de los adipocitos, estos como reserva energética del organismo y al degradarse liberan ácidos grasos y triglicéridos al torrente sanguíneo. La degradación de los adipocitos conllevan el incremento de la lipólisis, disminución de la lipogénesis e incremento de termogénesis, mientras que el músculo, tiende a acumular las altas concentraciones de Clb, la cual, lo convierte en un anabólico para el animal con un periodo de acción prolongado, considerar que la biotransformación a nivel muscular esto conlleva posiblemente, el aumento de la fibras muscular, esta obedece a que hay un incremento de la síntesis de proteínas, disminución de la degradación de proteínas, aumento de la glucólisis, en la producción de lactato y de la utilización de oxígeno. En el páncreas hay una disminución en la producción de insulina y en el aumento del glucagón, provocando en el animal una diabetes; mientras que en el hígado ocurre un incremento de la glucogenólisis y de la gluconeogénesis, esto conlleva en el animal daños hepáticos como la fibrosis-cirrosis, el cual, se detectó en un 62.3% de los animales estudiados, al igual que la presencia de quistes a nivel hepático.

La fosfatasa ácida prostática de los animales ACS su valor detectado fue de  $3.87 \pm 0.30$  U/L, en comparación con los animales tratados con Clb, cuya concentración fue detectada fue de  $11.3 \pm 1.2$  U/L. En su mayoría de los animales presentaron valores muy elevados en la fosfatasa acida total, no prostática y prostática, esto inducido probablemente a la termogénesis testicular, produciendo alteraciones en la morfología espermática. Todos los valores detectados con respecto al control de cada uno de estos parámetros son significativos  $p < 0.01$  (Figura 5).



**Figura 5:** se muestran los valores de la Fosfatasa Ácida: total, No prostática y Prostática, demostrando que el Clb produce una elevación de esta enzima prostática, produciendo alteraciones en la morfología espermática. Si los valores de la fosfatasa ácida prostática son elevados como se demuestra en este estudio, indica presencia de un inicio de cáncer prostático si estos valores continúan elevados por un período de tiempo muy prolongado, por ende, se detectó malformaciones de espermatozoides en caso de todas las regiones de este.

Además, las concentraciones de colesterol para este estudio disminuyeron de  $264.5 \pm 0.33$  mg/dL a  $207.8 \pm 0.48$  mg/dL, esta disminución es significativa a  $p < 0.01$ . El colesterol suele bajar cuando hay disfunción toroidal inducida por exceso de aditivos alimenticios-Clb, ya que se sabe que la glándula tiroides estimula la eliminación del colesterol por secreción directa en la bilis y los ácidos biliares y también estimula su síntesis mediante su control del nivel funcional del hepatocito, donde se forma aproximadamente el 90% del colesterol

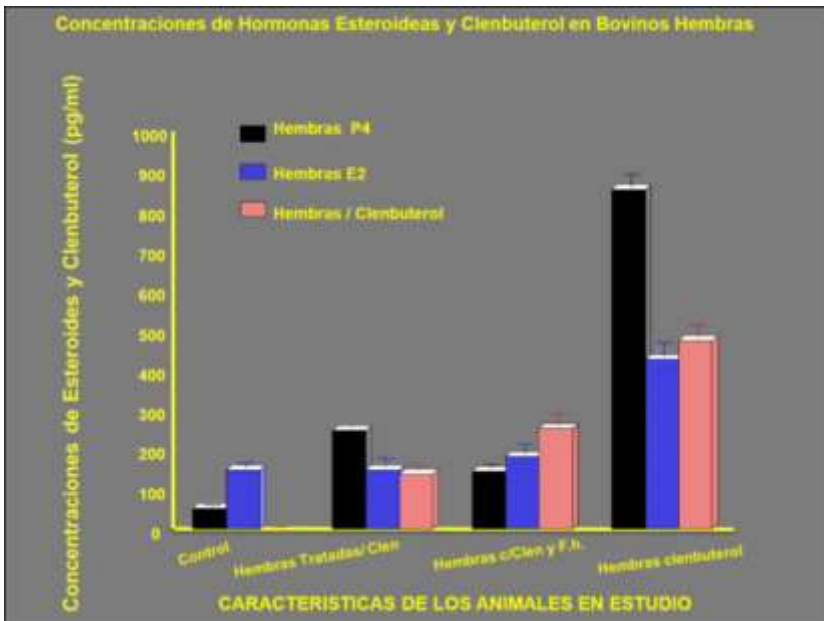
endógeno y esto puede aclarar la variabilidad de los cambios en la concentración sérica en patologías como hipertiroidismo e hipotiroidismo en los bovinos tratados con este  $\beta_2$ AA-Clb, por un periodo de tiempo más allá de lo reglamentados, ya que muchos productores someten a sus animales a más de 100 días de tratamiento y a concentraciones más elevada que la dosis anabólica, entre un 12 y 15 % más.

En cuanto a la Urea/Bun, constituye uno de los componentes nitrogenados más abundante no proteico en el organismo de los rumiantes, es el principal producto nitrogenado de desecho del catabolismo de las proteínas y solo se sintetiza en el hígado, los valores obtenidos para este estudio fluctuaron entre  $30.4 \pm 0,23$  mg/dL en ACS y en animals tratados en  $95.8 \pm 0,28$  mg/dL. Estos últimos valores muy incrementado y significativos ( $p < 0.01$ ). mostrando una deficiencia renal, ya sea por el incremento de la presión arterial a nivel del aparato yuxtglomerular.

Cabe también mencionar que los restantes metabolitos medidos no mostraron cambios significativos por tal motivo, en este estudio no lo mencionaremos, pero si queremos recalcar que todos los 17 metabolitos medidos hubo cambios de acuerdo con los valores de los ACS.

### **3. Efectos del Clb a las Hormonas esteroideas**

Cuando se detectaron los valores de hormonas esteroideas ligadas con la capacidad reproductiva en hembra se detectó valores de estradiol ( $E_2$ ) entre  $152.1 \pm 8.91$  a  $1152.3 \pm 89.74$  pg/ml, y valores de progesterona ( $P_4$ ), fluctuaron entre  $248.51 \pm 12,51$  a  $852.42 \pm 90.2$  pg/ml estos valores tan elevados de estrógenos y progesterona fueron obtenidos de hembras con anestros post parto muy prolongados mayor a 120 días (postparto) (Figura 6).



**Figura 6:** Se muestra las concentraciones de hormonas esteroideas en bovinos hembra: a) animales controles, b) hembras tratadas con Clb, c) hembras con Clb y *Fasciola hepatica*-Fh y d) hembras con clenbuterol, se aprecia que los valores de hembras con Clb y Fh. mostraron valores de hormonas P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub> más bajos que las hembras con Clb, demostrando que el Clb disfraza las afecciones hepáticas, ya que hembras con Clb y Fh, mostraron una alta prevalencia de quistes- fibrosis-cirrosis y tumores hepáticos, cosa que no se vio en hembras tratadas con Clb

## DISCUSIÓN

1. **Que es el clorhidrato de Clenbuterol y como actúa en animales de importancia alimentaria:**

El Clb posee una estructura química muy relacionada a las catecolaminas capaz de interactuar con receptores adrenérgicos, generalmente del tipo  $\beta_2$ . Químicamente es un amino-4-amino alfa T butilamino metil 3, 5 diclorobenzil alcohol (Figura 2). Su vida media es

de acción prolongada, con la particularidad de poder almacenarse en hígado y riñón. Según Boato, (2000); Dimaano, (2008) y Valladares *et al.*, (2013b), se metaboliza por medio de reacciones de N-oxidación en hidroxyclenbuterol y conjugados glucurónicos.

El Clb considerado como un aditivo sintético y que pertenece a una clase de medicamentos análogos fisiológicamente a la adrenalina (Mersmann, 1998). Químicamente se describe como polvo blanco, anhidro, muy soluble en agua y altamente estable a temperatura ambiente, su punto de fusión es de 174 a 175.5 °C, tiene la capacidad de interactuar con receptores adrenérgicos, generalmente del tipo  $\beta_2$  ( $\beta_2$ -agonista), (Ishikawa, 2009; Valladares *et al.*, 2013 a y 2014a, b y c).

Los agonistas adrenérgicos fisiológicos ( $\beta$ -adrenérgicos) son la noradrenalina y la adrenalina; la noradrenalina, constituye una catecolamina del grupo de las fenetanolaminas, también y se considerada como un neurotransmisor del sistema nervioso simpático, que se biosintetiza a partir de la tirosina y circula en el suero sanguíneo en concentraciones relativamente elevadas. La adrenalina del mismo grupo se sintetiza y secreta en la médula adrenal; circula en menores concentraciones que la noradrenalina en la mayoría de los mamíferos, pero en situaciones de estrés responde en mayor proporción que la noradrenalina. La noradrenalina es más selectiva de receptores  $\alpha$  y la adrenalina actúa sobre ambos, con mayor selectividad por los receptores  $\beta$ , pero con un efecto  $\alpha$  más dominante. Las respuestas fisiológicas se producen cuando estos agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos se unen a los receptores específicos (Badino *et al.*, 2005). Estas son moléculas orgánicas y los  $\beta_2$ -adrenérgicos que se unen a los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos-, dando lugar al complejo agonista-receptor ( $\beta_2$ AR), que a su vez activa a la proteína Gs. La subunidad  $\alpha$  de la proteína Gs activa a la adenilato-ciclasa-(ADC-asa), enzima que produce el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), está considerada como una de las principales moléculas de señalización intracelular. Esta molécula, produce sus efectos al unirse a la subunidad reguladora de la cinasa proteica A, para liberar la subunidad catalítica que fosforila a un buen número de proteínas intracelulares (Mazzanti *et al.*, 2003). Estas proteínas tienen papeles funcionales vitales para una variada gama de funciones que van a permitir la entrada de  $Ca^{++}$  a la célula, hasta

mediar la síntesis de proteínas clave para el funcionamiento celular (Mazzanti *et al.*, 2003).

El Clb es administrado a dosis entre y diez veces superiores a la terapéutica, a estas concentraciones ha de presentarse una acción anabólica, esto va a favorecer a la síntesis de proteína y disminuye a las grasas en la musculatura esquelética del bovino. Los receptores  $\beta$ AR, están presentes en la mayoría de las células de los mamíferos, aunque la distribución de los subtipos ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ ) y la proporción de cada uno de estos varía según el tejido y especie de animal (Mitchell and Gloor, 1998). Se considera a los  $\beta_1$  que predominan en el corazón estimulando su inotropismo (fuerza de contracción) y en el músculo liso intestinal induciendo relajación y los  $\beta_2$ AR se localizan en los bronquios y músculo uterino, provocando relajación en ambos casos, por ende, la magnitud de la actividad fisiológico-farmacológica de un agonista o agonista parcial  $\beta$  adrenérgico, dependerá de su denominada actividad intrínseca en el receptor y distribución en los tejidos blanco (Valladares *et al.*, 2014 a, b).

El Clb su efecto en condiciones fisiológicas produce el crecimiento del músculo esquelético, el cual, es el resultado primario de una hipertrofia y se detecta con el aumento de la síntesis proteica muscular y con una disminución en la degradación de proteína muscular o una combinación de ambas producen aumento de la masa muscular (Mersmann, 1998). Este permite el incrementar el flujo sanguíneo a ciertas regiones del cuerpo, lo cual, permite el proceso de hipertrofia en el músculo esquelético al transportar mayores cantidades de sustratos (Proteínas) y fuentes de energía para la síntesis de proteína (Ramos, 2009). Otra de sus principales acciones a nivel muscular es la disminución en la cantidad de la grasa en la célula. Se ha demostrado “*in vitro*” la degradación de triacilglicérols en adipocitos y la inhibición de la síntesis de ácidos grasos-AG y de triacilglicérol, el tejido de los animales presenta una actividad lipolítica aumentada (disminución de la grasa muscular), una actividad lipogénica disminuida, o ambas (Valladares *et al.*, 2013 a y c). La elevación de la concentración plasmática de ácidos grasos no esterificados después de la administración del Clb, confirma la actividad lipolítica que ocurre en los adipocitos (Caicedo *et al.*, 2011 y 2021).

El Clb acrecienta la perfusión sanguínea hacia el músculo, así como una mayor disponibilidad de energía y aminoácidos; como resultado se

produce un aumento en la síntesis y retención de proteínas y que favorecerá la hipertrofia muscular, principalmente de los músculos de los cuartos traseros del animal. En el músculo, además de la hipertrofia, ocurren cambios en el tipo de fibra muscular, también hay cambios en la proporción de ARN de transcripción para proteínas musculares como la miosina y actina (Meyer and Rinke, 1991). En ovinos y bovinos se ha observado que aumenta el peso de los músculos en 40%, y que la magnitud de la respuesta varía dependiendo del  $\beta$  adrenérgico suministrado, así como de la influencia de factores como la especie, la raza, la edad, el sexo y la dieta (Barry y Graham, 2013 y Caicedo *et al.*, 2021).

Según Mersmann, (1998) y Caicedo *et al.*, (2021), el Clb es considerado como un Beta<sub>2</sub>-agonista-adrenérgico ( $\beta_2$ -AA) y un anabólico no esteroideo utilizado en la actualidad para el dopaje en el deporte. Esta sustancia es conocida por el inducir hipertrofia del tejido musculoesquelético. El mecanismo preciso de cómo produce este efecto de hipertrofia no está muy bien dilucidado; sin embargo, la hipótesis más aceptada es que induce a este efecto a través de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, por la regulación controlada de la expresión de los factores de crecimiento de la insulina (IGFs) que juegan un papel esencial en el desarrollo, el crecimiento y la regeneración del tejido musculoesquelético.

Histológicamente, las células satélites de los músculos esquelético son mononucleadas y residen entre el sarcolema y la lámina basal de las miofibrillas adultas. En respuesta a los estímulos como son la carga mecánica, descarga, denervación, y lesión son activadas a través de varios factores de crecimiento que contienen IGFs (Boato, 2000; Mersmann, 1998), esta activación permite que haya cambios adaptativos como es la hipertrofia, la alteración del tipo de fibras y la regeneración (Valladares *et al.*, 2014b).

Para los  $\beta_2$ AA es muy importante el reemplazo del anillo aromático, el reemplazo de este permite una actividad biológica específica a nivel muscular, ya que se hace para obtener una actividad biológica definida. Hay que considerar, que cuando los OH (hidroxilo) son sustituidos por un halógeno como en el caso del Clb por cloro, se evita la biotransformación por las enzimas COMT (*catecol-O-metiltransferasas*),



a nivel tisular y se hace muy lenta la biotransformación hepática (Boato, 2000), la presencia de este halógeno cloro, lo hace más liposoluble que sus análogos, y, por ende, tiende a difundir más en los tejidos y en la grasa animal (Mersmann, 1998; Valladares *et al.*, 2014b, Caicedo *et al.*, 2021).

## 2. Efecto del Clb detectados en este estudio

Para este estudio hay que considerar que una de las características más importantes en cuanto a la estructura del Clb es que posee un halógeno en su estructura química el cual es el ión cloro, este ión cloro (Cl), permite retardar la actividad metabólica del Clb, por ello, su efecto es mucho más prolongado que otros agonistas  $\beta_2$ -AA y su excreción total también es más retardada (Martin 1971, Ruffolo, 1991, Waldeck y Widmark, 1995). Además, no está muy bien dilucidado el efecto que tiene el Clb en las actividades del sistema reproductor en hembras y machos, porque en los animales con una alta ingesta de Clb, la actividad reproductiva disminuye, (Caicedo *et al.*, 2010 y 2011, Paz-Calderón *et al.*, 2011), por otro lado, hay aumento de la fosfatasa acida prostática posiblemente por el efecto termogénico del Clb, este fenómeno calórico lo que hace es alterar la morfología del esperma (Paz-Calderón *et al.*, 2011). Además, podemos considerar que los  $\beta_2$ -AA estimulan a la glándula suprarrenal al producir glucocorticoides y corticoides (dexametasona y betametasona); el efecto del Clb a nivel de esta glándula adrenal aún no está bien claro. Es probable que en hembras estimule la producción de esteroides ( $P_4$  y  $E_2$ ) a nivel de los ovarios como progesterona y estradiol y en machos incrementa los niveles de testosterona (T) y fosfatasa ácida prostática, sin embargo, se desconoce el daño probable que puede producir el clenbuterol en los órganos reproductivos (Caicedo *et al.*, 2011 y 2021), debido a que en ellos se producen estos esteroides, es probable que el Clb en las glándula suprarrenal, incremente los glucocorticoides y mineralcorticoides, que también pueden llegar a incrementar los esteroides (estrógenos y progestanos) a través de este órgano (Caicedo *et al.*, 2011 y 2021).

Se puede considerar que el Clb produce un incremento de la actividad del sistema nervioso, que conduce a la pérdida del apetito, el cual, puede ser debido a la sensación de malestar del animal o a la

actividad glucogenolítica y lipolítica, bloqueando los centros del apetito mediante señales de sobrecarga procedentes de los receptores quimiostáticos (Caicedo *et al.*, 2009 y Saavedra *et al.*, 2019). Al ser capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica, es viable que la reducción del consumo de alimentos pueda ser atribuida a un exceso de la estimulación de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos ( $\beta$ -AR) a nivel del sistema nervioso central. Los efectos promotores del crecimiento ejercidos por el Clb son fuertemente mediatizados por la estimulación directa de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos ( $\beta_2$ -AR) (Helferich *et al.*, 1990, Ni *et al.*, 2010), localizados en el tejido muscular y también, indirectamente por las variaciones de las concentraciones plasmáticas de hormonas catabólicas o anabólicas (Higgins *et al.*, 1988), como puede ser el caso de los glucocorticoides, la hormona del crecimiento (GH) o la insulina. Si las hormonas pueden alterar la respuesta del tejido adiposo frente a las catecolaminas endógenas, también pueden afectar a la respuesta de la musculatura esquelética frente a los agonistas  $\beta_2$  exógenos, (Sumano *et al.*, 2002). El estudio comprueba que el clenbuterol, por lo tanto, modifica la composición muscular de los animales, puesto que en animales tratados con  $\beta_2$ -AA, se observa un aumento en el depósito de proteína (15%) y una disminución en la de grasa (18%) (Lueso y Gómez, 1990).

El crecimiento muscular, como respuesta al tratamiento con  $\beta_2$ -AA, es una hipertrofia del tejido muscular esquelético estriado, lo que se demuestra por los estudios realizados por Beermann *et al.*, (1983 y 1986) en ratas y por Martín *et al.*, (1990) en vacas. Los efectos de los  $\beta_2$ -AA sobre el sistema endocrino, son debidos en gran parte a la liberación de otras hormonas (Caicedo *et al.*, 2009, 2011 y Saavedra *et al.*, 2019).

Entre las acciones de las catecolaminas están la inhibición de la secreción de insulina, el aumento de glucagón y el estímulo de la liberación de hormona adrenocorticotropa (ACTH), somatotropa (STH) y gonadotropinas como: FSH y LH, (Beermann *et al.*, 1987). Sin embargo, existe una sorprendente falta de información sobre los efectos del Clb en la glándula adrenal, que es aún más sorprendente, si se piensa que existen receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -AR) en esta glándula, que la médula adrenal es uno de los tejidos que sintetizan y secretan las catecolaminas naturales adrenalina y noradrenalina y que la glándula

adrenal sintetiza y secreta los glucocorticoides, por último, hay que considerar que la implicación directa de esta glándula en los mecanismos de adaptación del organismo al estrés, tanto, a corto como a largo plazo.

Los efectos de los  $\beta_2$ -AA en el metabolismo de las grasas son muy difíciles de definir, sin embargo, actúan indirectamente en la deposición de grasa, al aumentar la velocidad metabólica y el gasto energético de los animales tratados y al reflejarse con la termogénesis, parte de la energía ingerida evita la formación de grasa y por otra parte el efecto directo está en el aumento de los niveles de AMP cíclico en el tejido adiposo, el ATP se transforma en AMP cíclico que activa a ciertas proteínas como las proteínas quinasas que por fosforilación estimulan a una lipasa intracelular que transforma los triglicéridos en ácidos grasos y glicerol. Este mecanismo aumenta la lipólisis y disminuye la lipogénesis, igualmente este mecanismo dependerá de la especie animal en que estemos tratando, es por ello, que el aumento de la concentración administrada y el tiempo en que los animales son sometidos a este  $\beta_2$ -AA, juega un papel muy importante en el efecto a corto y mediano plazo, para la administración de este. En base a los estudios previos y los datos que se han obtenido en este estudio se puede agregar lo siguiente: La administración de Clb, a dosis anabolizante, causa una alteración de la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal-gonadal-hepático en bovinos, que en algunos casos es reversible, después de un período de retirada o cuarentena. Además, que las rutas del Clb en bovino, el cual, conlleva la formación de: 4-nitro-clenbuterol, hidroxilamina de clenbuterol, ácido 4-amino sulfónico de clenbuterol, alcohol-hidroxilamina 2,5-dicloro-a-bencil y ácido 4-amino-3,5-dicloromandelico, todos estos componentes son altamente tóxicos para la fisiología animal según Fiems (1987), Zalko 1997 a y b; Caicedo *et al.*, (2021) (Figura 7).

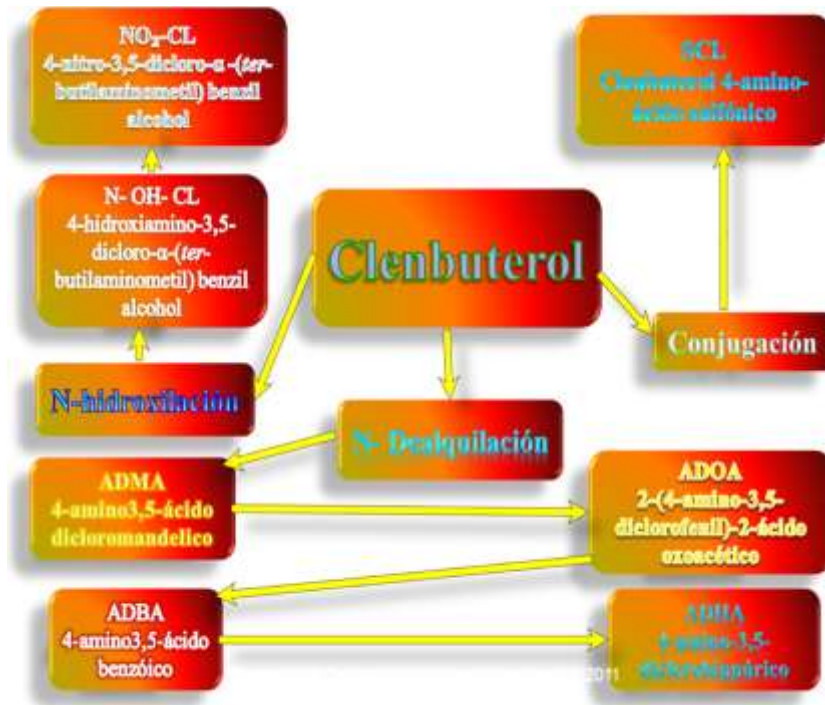
Se puede considerar que la respuesta máxima de  $\beta_2$ -AA-clembuterol se ve afectada por la dosis administrada y la duración de una dosis sostenida (Ricks *et al.*, 1984). Esto ha sido bien documentado y que el aumento de cAMP mediado por  $\beta$ -AR es temporal y que la activación continua del receptor por el ligando  $\beta$ -AA es necesaria para mantener los niveles de cAMP para sostener la respuesta. La exposición a una dosis constante de  $\beta$ AA para el receptor eventualmente causará una

desensibilización o inactivación aguda de la señalización mediada por el receptor. La fosforilación tanto de la proteína quinasa A-(PKA) como de las quinasas  $\beta$ -AR son los pasos principales para iniciar la cascada de señalización que sigue a la activación de cAMP por  $\beta$ -AR (Hausdorff *et al.*, 1990). La desensibilización aguda puede evitarse hasta cierto punto aumentando la dosis y potenciando la señal. La exposición a largo plazo (crónica) a dosis elevadas de  $\beta_2$ -AA conduce a la internalización o pérdida del receptor de la superficie celular y a la disminución de la abundancia de ARNm de  $\beta$ -AR (Hausdorff *et al.*, 1990). Estas alteraciones parecen ser irreversibles al menos en el período de alimentación a corto plazo. Sin embargo, adicionalmente a todo esto Sauer *et al.*, (1995) detecto que al evaluar la cinética de Clb en becerros holstein-friesian, a los que se les suministraron una dosis de 10  $\mu$ g/kg de peso cada 12 h durante 21 días, encontraron residuos en suero sanguíneo a las 6 h, 1, 2, 4, 8 y 16 días después de iniciado el tratamiento. Desde el día 2 de retiro del Clb, al sacrificio de los bovinos, las concentraciones más elevadas detectadas se encontraron en hígado, riñón, bilis y orina. En estudios realizados en *Rattus norvegicus*, según FAO-OMS, consideraron que la administración de Clb aumentó la incidencia de leiomiomas meso-ováricos después de haber recibido dosis de hasta 25 mg/kg de peso al día. Concluyeron que estos se deben más a una estimulación adrenérgica y no tanto a factores de tipo genotóxico, lo mismo se puede decir que sucedió con ratones expuesto con el Clb, según Valladares-Carranza *et al.*, (2017), donde hubo incremento de la masa muscular y alteraciones a nivel del hígado y corazón en este se detectó a través del estudio histopatológico de las fibras cardiacas engrosamiento y rizamiento de fibras musculares, pleomorfismo e hileración nuclear, esto relacionado con lo hipertrofia muscular del músculo cardiaco. Mientras que a nivel hepático de los animales tratados con Clb las lesiones observadas fueron: tumefacción y degeneración hidrópica de moderada a difusa, mitosis, picnosis y megalocitosis con megacariosis de hepatocitos, esto provoca lesiones a través de los hepatocitos provocando alteraciones de estos en la producción de la bilis, por ello las altas concentraciones en bovinos de la bilirrubina detectados en este estudio. En el hígado de los ratones expuestos a Clb se observaron alteraciones importantes, que ponen de manifiesto su efecto tóxico (Valladares-Carranza *et al.*, 2014a y b y 2015).

El Clb en el organismo de los animales tiene una función y acción prolongada, como se ha mencionado tiende a almacenarse primordialmente en hígado y riñón (por ser estos órganos de filtración de componente y reguladores de la homeostasis) y se metaboliza por medio de reacciones de N-oxidación en hidroxiclembuterol y conjugados glucurónicos (Mazzanti *et al.*, 2003 y Valladares-Carranza *et al.*, 2015). Zalko *et al.*, (1997a), manifestó que los metabolitos del Clb: N-hidroxilarilamina y N-nitroso clembuterol, poseen propiedades tóxicas de riesgo tanto para la salud animal como para el humano. Otro caso muy particular del efecto del Clb en conejos a los que se les administraron dosis de 30 µg-50 mg/kg de peso al día se observaron signos de feto toxicidad, como retraso de la osificación y paladar hendido. Por otro lado, estudios realizados por Carrola *et al.*, (2003), en dos casos humanos estos presentaron signos de tremor muscular, náuseas e incoordinación; a la auscultación mostraron un incremento de la frecuencia cardíaca, incremento de la presión arterial y en el examen hematológico presentaron: leucocitosis, acompañada de neutrofilia, hipercalemia e hiperglucemia, mismos que se dan a nivel de los bovinos que son sometidos a la alimentación con el  $\beta_2$ AA-Clb. Sería muy interesante realizar investigaciones de este tipo en bovinos, aves o porcinos, además de que son las especies en las que más se llega a usar, y las que se consumen en mayor frecuencia y cantidad en el mercado nacional (SIAP, 2009). Según estudios de Avilés-Martínez *et al.*, (2019) detectaron valores de Clb en altas concentraciones en bovinos un 69.3% de los animales muestreados entre rastros municipales, otros estudios por Caicedo *et al.*, (2021) detectaron un 62.3% de animales positivo a Clb de una población de 36,000 bovinos muestreados en rastros municipales, indicando que no hay medidas pertinentes al uso de este componente (Caicedo *et al.*, 2021), a pesar de que la norma de prohibición existe en México (Norma Oficial Mexicana NOM061-ZOO-1999, que prohibió su empleo, producción, comercialización y administración en animales de consumo humano en el país (SAGARPA, 2000) y que desde el año 2002 se vienen presentando intoxicaciones en humanos por el consumo de vísceras y carne procedentes de este producto proteico contaminado con este Clb.

Finalmente, los  $\beta_2$ -agonista-adrenérgicos son análogos de las catecolaminas epinefrina y norepinefrina. Pueden funcionar a través de

adrenoceptores beta específicos ( $\beta$ AR) en la superficie de los adipocitos y las células del músculo esquelético. Está comprobado que el  $\beta_2$ AA. Clenbuterol promueve el crecimiento, de igual manera esta dilucidado hasta cierto punto que estos medicamentos Clb y zilpaterol reducen la grasa total de la canal y aumentan la proteína total de la canal en cuatro especies: bovinos, ovejas, ave doméstica y ratas. Muchos agonistas  $\beta$ -adrenérgicos reducen los lípidos de la canal estimulando la lipólisis y bloqueando la lipogénesis en el tejido adiposo.



**Figura 7:** Biodisponibilidad y Biotransformación del Clenbuterol en bovinos y posibles rutas metabólicas del Clenbuterol en las diferentes estructuras del bovino: hígado principalmente, páncreas, riñón, y pulmón a nivel del sistema nervioso y glándulas suprarrenal, según Fiems (1987), Zalko 1997 a y b y Caicedo et al., 2011 y 2021.

## CONCLUSIONES

Para este estudio podemos considerar las siguientes conclusiones:

- 1- El Clb contribuye al incrementar la masa muscular en bovinos a expensas de alterar su bienestar, provocando alteraciones en los metabolitos sanguíneos ligados a sus procesos de homeóstasis,
- 2- Por ende, afecta los genes que regulan el metabolismo celular y de órganos en los bovinos,
- 3- La hipertrofia acelerada producida por este  $\beta_2$ AA no es la ideal por el tiempo en que se presenta, alterando los procesos hormonales y procesos del sistema nervioso central y periférico,
- 4- El Clb contribuye a alteraciones en la producción de hormonas esteroideas inhibiendo la actividad ovárica en hembras, produciendo anestro muy prolongados,
- 5- Mientras que en macho produce alteraciones a nivel de las células precursoras de la espermatogénesis, las espermatogonias, produciendo malformaciones a nivel de cola y cabeza del espermatozoide,
- 6- Un exceso en la dosis del Clb produce alteraciones en los niveles de fosfatasa ácida provocando posiblemente cáncer prostático en bovinos, produciendo atrofia testicular
- 7- El órgano que mayores alteraciones se producen es el hígado, provocando quistes, fibrosis hepática, telangiectasias, alterando la función de los hepatocitos en producir bilis y acumulándose esta en los canalículos biliares produciendo alteraciones a nivel estructural del hígado, posible Granulomatosis hepática.
- 8- El Clb enmascara muchas patologías hepáticas como la fasciolosis bovina, produciendo en los animales que la padecen hepatitis.

Sin embargo:

- a) El  $\beta_2$ -AA-Clembuterol mejora consistentemente el rendimiento del ganado de carne y aumenta el crecimiento muscular cuando se mezcla con raciones de terminación.

b) Cambios en la abundancia del ARNm de múltiples genes asociados con la diferenciación miogénica pueden indicar un efecto importante de  $\beta_2$ AA sobre la proliferación, diferenciación y / o el reclutamiento de las células satélite en las fibras musculares para promover la hipertrofia muscular

c) La actividad fisiológica del Clb, depende de la actividad inherente del receptor y su absorción, tasa de metabolismo, eliminación y distribución en el tejido blanco

d) Hay que considerar que el ganado bovino que recibe  $\beta_2$ -AA- clenbuterol tiende a tener puntajes de marmoleo muy bajos, menor cantidad de la grasa dorsal y mayor dureza de la carne y altos niveles en el contenido de  $H_2O$ , alrededor de un 30% más que un animal alimentado orgánicamente.

e) La elevación de los tipos de fibras glucolíticas con el tratamiento con  $\beta_2$ -AA- clenbuterol es la principal responsable del aumento de la hipertrofia muscular, sin embargo, se correlaciona negativamente con la cantidad de tejido adiposo, tanto intramuscular como intermuscular,

f) Finalmente, la disponibilidad y la biotransformación del Clb en tejidos y órganos dependerá de la concentración y tiempo en la que los bovinos son sometidos a este anabólico, el cual, se tienen pruebas que se les administran más de las dosis anabólicas permitida, y por mayor tiempo estipulados en los lineamientos de la administración de anabólicos sintéticos en animales domésticos de importancia alimentaria, el cual, no debe ser, ya que afecta al propio animal, su bienestar y finalmente al consumidor, al hombre.

A pesar, que existe una prohibición (normatividad) en su aplicación a animales de importancia alimentaria se sigue administrando, esta administración no está regulada en general por personal profesional idóneo en la materia.



## AGRADECIMIENTOS

A las autoridades de investigación de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a los rastros municipales que participaron en autorizar la toma de muestras sanguíneas y órganos de los bovinos y fincas privadas involucradas, como también a todos los estudiantes que participaron en este estudio de investigación a todos, gracias.

Aclaremos que este trabajo no tiene ningún tipo de interés particular, solo se quiere demostrar que hace falta muchas investigaciones en pro de incrementar la calidad-sustentable de la vida del animal y su bienestar, para asegurar la producción de alimentos inocuos en nuestra región y mejorar el medio ambiente.

Igualmente, hay que aclarar que las dosis de Clb administradas no fueron dadas por los autores de este estudio, sino que ya los ganaderos administraban dosis desde 5 a más de 10 veces su concentración terapéutica, y que los autores realizaban supervisión sobre la administración de este  $\beta_2$ AA, en fincas donde se nos autorizaba, ya que en muchas no se nos permitía entrar. Cabe recalcar que muchos muestreos fueron realizados en fincas particulares y en su mayoría en rastros municipales, donde este aditivo ya es un problema, por ende, no tenemos ningún tipo de responsabilidad e inherencia en la administración de este componente  $\beta_2$ AA-Clb, y los animales antes de realizarle su muestreo pasaban por inspección veterinaria del patólogo de cada rastro, nuestra función fue solo y únicamente el muestreo de sangre, palpación de hígados y ganglios linfáticos y obtención de órganos principalmente de aquellos con signos patológicos visibles.

## REFERENCIAS

- Avilés-Martínez J.A, Velázquez-Ordóñez V, Valladares-Carranza B, Zaragoza-Bastida A, Felipe-Pérez YE, Ortega- Santana C, Rivero-Pérez N, Aparicio-Burgos JE y Gutiérrez-Castillo Ad. (2019). Determinación de clorhidrato de clenbuterol en orina de bovinos en tres rastros municipales del estado de México. Rev Med Vet. ;(38): 111-118. Doi: <https://doi.org/10.19052/mv.vol1.iss38.10>

- Barry, A.R. and Graham, M.M. 2013. Case report and review of clenbuterol cardiac toxicity. *J. Cardiol. Cases*, 8:131-133.
- Beermann, D.H., Bittler WR., Hogue DE., Fishell V.K., Dalrymple RH., Ricks CA., and Scanes CG. (1986). Toxicity of Clenbuterol, beta adrenergic in animals. *J. Animal Sci.* 65:1514-1524.
- Beermann D.H, W.R. Butler, D.E. Hogue, V.K. Fishell, R.H. Dalrymple, C.A. Ricks, and C.G. Scanes. (1987). Cimaterol-induced muscle hypertrophy and altered endocrine status in lambs. *J. Anim. Sci.* 65:1514-1524.
- Beermann, D.H. (1993). Beta-adrenergic agonist and growth. In: M.P. Shreibman, C.G. Scanes, and P.K.T. Pang (ed.) *The endocrinology of growth, Development, and Metabolism in Vertebrates*, pp 345-366. Academic Press, San Diego, C.A.
- Boato, G. 2000. Synthesis and characterization of new beta agonists of probable illicit use in animal productions. In: Van Ginkel, L.A. and Ruitter, A. (Eds), *Residues of Veterinary Drugs in Food*. Veldhoven, NL, 237-241.
- Caicedo R. R.E., Torres Beltrán A., Hernández, Zepeda J.S., Reséndiz Martínez R., Pérez y Terrón. R. y Cabrera Bautista E. (2009). Effects o beta agonist in the diagnosis of fascioliasis in animal ruminant *Bos indicus X Bos taurus*, in the State of Puebla, Mexico. In *International Symposium on sustainable Improvement of animal production and health*. FAO/IAEA, Vienna, Austria, Vol1: 183-187.
- Caicedo R. R.E., Torres Beltrán A., Martínez Badillo, S.V., Paz Calderón Nieto M., Ramírez Peñaloza M.P., Hernández, Zepeda J.S., Reséndiz Martínez R., Cabrera --Bautista E., y Silvia Gómez S.E. (2010). Efectos de los beta-agonistas (clenbuterol), en las actividades fisio hepáticas y reproductivas en rumiantes, En: XI Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogénéticos. Joao Pessoa- Paraíba-Brasil, pp. 460-465. ISSN:2567-1954-7.
- Caicedo Rivas. R.E., Paz-Calderón Nieto, M. y Badillo M. S.V. (2011). Clembuterol ( $\beta_2$ -agonista Adrenérgico, enmascara las patologías hepáticas en bovinos. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*. Vol.1: 327-331.

- Caicedo Rivas R.E., Paz-Calderón Nieto M., Estrada Poblano. M. (2021). Effects of B<sub>2</sub>-adrenergic agonist (B<sub>2</sub>AA), in the Physiology of *Bos taurus* X *Bos indicus*. Brazilian Journal of Animal and Environmental Research. Vol 4, No. 2, page. 1667- 1683. ISSN: 2595-573X. DOI: 10.34188/bjaerv4n2-010.
- Carrola P, Devesa N, Silva JM, Ramos F. (2003). Intoxicacao por agonista beta-adrenergic. Acta Med Port.;16:275-8
- Courtheyn D., Merman's R., Schilt R., y Boenke A. (1996). Beta-agonists in animal feed. II. Optimization of the extraction. Food Additives Contam. 13:493-509.
- Dimaano, J.Q. 2008. Street drugs possibly tainted with Clenbuterol. J. of Emergency Nursing, 34: 582-583.
- Fiems, L O. (1987). Effect of beta-adrenergic agonists in animal production and their mode of action. Annales de Zootechnies. 36(3), 271-290.
- Hausdorff WP, Lohse MJ, Bouvier M, Liggett SB, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1990). Two kinases mediate agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the beta 2-adrenergic receptor. *Symposium Soc Exp Biol.*; 44:225–240.
- Helferich W.G, Jump D.B., Anderson D.B., Skjaerlund M.D., Merkel R.A., Bergen W.G. (1990). Skeletal muscle a-actin synthesis is increased pretranslational in pig fed the phenetholamine ractopamina. *Endocrinology*; 126:3096-3100.
- Higgins J.A., Lassett Y.V., Bardsley R.G, Buttery P.J. (1988). The relation between dietary restriction or clenbuterol treatment on muscle growth and calpain proteinase (EC3.4.22.17) and calpastain activities in lamb. *Br. J. Nutr*; 60:645-652.
- Ishikawa, C. (2009). Effects of Clenbuterol, a  $\beta_2$  – adrenergic agonist, on Sizes of Masseter, Temporalis, Digastric, and Tongue muscles. *The Open Dentistry J.*, 3: 191-196.
- Johnson B.J., Smith S. B. y Chung K.Y. (2014). Historical Overview of the Effect of  $\beta$ -Adrenergic Agonists on Beef Cattle Production. *Asian-Australas J Anim Sci.* Vol. 27, No. 5: 757-766.
- Kuiper H. A., Noordam, M. Y., van Doore-Flipsen, M. M. H., Schilt, R. & Roos, A. H. (1998). Illegal Use of  $\beta$ -Adrenergic Agonists: European Community. *J. Anim. Sci.* 76:195-207.

- Kuri M.P.; Parres, FJA.; Aguilar V.K. and Mújica V.Y. (2007). Intoxicación por Clenbuterol (segunda y última parte). Boletín del Centro Nacional de Vigilancia epidemiológica.
- Lueso Sordo, M.J. and Gómez Berzal, M.A. (1990). Mundo Ganadero 7: 12-16.
- Mazzanti G, Daniele C, Boatto G, Manca G, Brambilla G, Loizzo A. (2003). New  $\beta$ -adrenergic agonists used illicit as growth promoters in animal breeding: chemical and pharmacodynamic studies. *Toxicol*; 187(2-3):91- 9. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00059-3).
- Mersmann, H.J. (1998). Overview of the effect of beta-adrenergic receptor agonist on animal growth including mechanism of action. *J. Anim. Sci.* 221:502-508.
- Meyer, H.H.D. y Rinke, M.L. (1991). The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *J. Anim. Sci.* 69:4538-4544.
- Maltin, C.A., Delday, M.I., Hay, S.M. Innes, G.M. and Williams, P.E.V. (1990). Effect of beta-adrenergic in beef. *Brit. J. Nutr.* 63: 535-545.
- Martin L.E, Hobson JC, Page JA, Harrison AC. (1971). Metabolic studies of Salbutamol-3H: a new bronchodilator in rat, rabbit, dog, and man. *Eur. J Pharmacol*; 14: 183-199.
- Mersmann, H.J. (1998). Overview of the effects of beta-adrenergic receptor agonist on animal growth including mechanisms of action: *Journal of Animal Science.* 76:160-172.
- Mersmann, H.J. (2002). Beta-Adrenergic receptor modulation of adipocyte metabolism and growth. *Journal of Animal Science*, Volume 80, Issue E-suppl-1, 2002, Pages E24-E29, <https://doi.org/10.2527/animalsci2002.0021881200800ES10005x>
- Mitchell, G.A. and Glora, D. 1998. Illegal use of  $\beta$ -adrenergic agonistic in the United States. *J. Anim. Sci.*, 76:208-211.
- Ni Y, Zhang Q, Kokot S. (2010). Analysis of the interactions of mixtures of two beta-agonists steroids with bovine serum albumin: a fluorescence spectroscopy and chemometrics investigation. *Analyst.*; 135(8):2059-68.
- Olivares Sáenz, E. (1994). Paquete de diseños experimentales. FAUANI. Versión 2.5. Facultad de Agronomía. UANL. Martín. NL.

- Paz-Calderón Nieto M., Caicedo Rivas. R.E. y Hernández Pérez, B. (2011). Effect of clenbuterol in the levels of acid phosphatase “Prostatic Fraction”, in cattle males. *Actas Iberoamericanas de Conservación animal*. Vol.1: 136-40.
- Ramos, F., Baeta, M.L., Reis, J. and Silveira, M.I.N. (2009). Evaluation of the illegal use of clenbuterol in portuguese cattle farms from drinking water, urine, hair and feed samples. *Food Addit Contam.*, 26 (6):814-820.
- Ricks CA, Dalrymple RH, Baker PK, Ingle DL. (1984). Use of a  $\beta$ -agonist to alter fat and muscle deposition in steers. *J Anim Sci*. 59:1247–1255.
- Ruffolo RE. (1991). Chirality in  $\alpha$  and  $\beta$ -adrenoceptor agonists and antagonists. *Tetrahedron*; 47:9953-9980.
- Saavedra-Rodríguez, A., Caicedo Rivas, R.E. Paz-calderón Nieto, M., Estrada Poblano, M. (2019). Physiological Effect of B2-agonist adrenergic “Clenbuterol” in the cattle *Bos taurus* X *Bos indicus*, in the Estate of Puebla, México. *Agroproductividad*. Vol.12, Num. 6, pp:63-68, <https://doi.org/10.32854/agrop.v0i0.1378>.
- SAGARPA. (2000). NOM-061-ZOO-1999. Especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal. México, D.F. Diario Oficial de la Federación
- Sauer M. J., Ickett, R. J. H., Limer, S. & Dixon, S. N. (1995). Distribution and elimination of clenbuterol in tissues and fluids of calves following prolonged oral administration at a growth-promoting dose. *J. Vet.Pharmacol. Therap*. 18:81-86.1995.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Producción, peso y valor de ganado en Pie [internet]. (2009). Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/index.php?option=comwrapper&view=wrapper&Itemid=371>
- Smith DJ. (1998). The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of beta-adrenergic agonists in livestock. *J. Anim. Sci*; 76:173-194.
- Smith S.B., Gracia D.K., Anderson D.B., (1989). Elevation of a specific mRNA in longissimus muscle of steer fed ractopamina. *J. Anim. Sci*; 76:3495-3520.
- Sumano, L.; Ocampo C., Gutiérrez O. (2002). Clenbuterol y otras betas agonistas, Una opción para la producción pecuaria o un Riesgo para la salud humana? *Vet. Mex*; 33 (2), 137-159.

- Valladares CB, Montes de Oca JR, Zamora E JL, Velázquez OV, Posadas ME, Peña BSD. (2013a) Influence of the use of additives and growth promoters on the herd health. In: Salem AFZM. Feed nutrients and animal health. Roles of some nutrients in animal health. Deutschland: Lambert Academic Publishing.
- Valladares, C.B., Velázquez, O.V., Zamora, E.J.L., Aviles, M.J.A., Zaragoza, B.A. and Posadas, S.M.A. (2013b). Implications of the Use of Clenbuterol Hydrochloride in Beef Cattle. In: Salem AFZM. Nutritional Strategies of Animal Feed Additives, New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Valladares, C.B., Velázquez, O.V., Posadas, M.E., Peña, B.S.D., Zamora, E.J.L., Ortega, S.C., Alonso, F.U. (2013 c). Determinación de clorhidrato de clenbuterol en suero sanguíneo de bovinos para abasto del estado de Guerrero, México. En: Beatriz Nava Moreno. Seguridad Alimentaria y Producción Ganadera en Unidades Campesinas. México, Universidad Autónoma de Chapingo.
- Valladares, C.B., Bañuelos, V.R., Peña, B.S.D., Velázquez, O.V., Velázquez, A.Y. and Nava, O.A. (2014a). Illegal use of clenbuterol in cattle production in México. Health, 6:673-676. <http://dx.doi.org/10.4236/health.2014.68087>.
- Valladares, C.B., Bañuelos, V.R., Peña, B.S.D., Velázquez, O.V. y Zamora, E.J.L. (2014 b). Biocinética y lesiones histológicas del clorhidrato de clenbuterol en modelo conejo. En: M. Ramos, V. Aguilera. Ciencias Agropecuarias, Handbook – ©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato. pp. 61-69.
- Valladares-Carranza B, Bañuelos-Valenzuela R, Peña Betancourt SD, Velázquez-Ordóñez V, Echavarría Chairez FG, Muro-Reyes A. (2015). Efecto del clorhidrato de clenbuterol sobre el funcionamiento hepático en modelo conejo. Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales [internet]. 1(1): 16-23. Disponible en: <http://www.ecorfan.org/spain/researchjournals/Ciencias-Ambientales> y Recursos Naturales/vol1num1/ Revista-Ciencias-Ambientales-23-30.pdf
- Valladares-Carranza, B., Bañuelos-Valenzuela, R., Peña-Betancourt, S.D., Velázquez-Ordóñez, V., Echavarría-Cháirez, F.G., Ortega-Santana, C., Sánchez-Torres, J.E. y Lozano-Carbajal, B. (2017). Efecto del

- clorhidrato del clorhidrato de clenbuterol de clenbuterol en la ganancia de peso y lesiones histológicas en la ganancia de peso y lesiones histológicas en ratones. *Rev. Med Vet.* ;(35): 129-136. Doi: <https://doi.org/10.19052/mv.4395>
- Waldeck B, Widmark E. (1995). Steric aspects of agonism and antagonism at  $\beta$ -adrenoreceptors: experiments with the enantiomers of clenbuterol. *Pharmacol Toxicol*; 56:221-227.
- Zalko D, Bories G. y Tulliez. (1997-a). Metabolic fate of clenbuterol in calves. *Agric. Food Chem.* 1998, 46, 5, 1935–1943.
- Zalko D, Debrauwer L., Bories G. y Tulliez J. (1997-b). Evidence for a new and major Metabolic Pathway of Clenbuterol Involving *in Vivo* Formation of an *N*-Hydroxyarylamine. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 2, 197–204.

## Capítulo 4

### Conocimiento y práctica de médicos respecto a enfermedades transmitidas por artrópodos

*Ilse Francisco-Flores<sup>1</sup>, José Lino Zumaquero-Ríos<sup>2</sup> y César Antonio Sandoval-Ruiz<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>Laboratorio de Artropodología y Salud, Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. Blvd. Valsequillo y Av. San Claudio Edificio BIO 1, Ciudad Universitaria Col. Jardines de San Manuel, C.P. 72570 Puebla, México.

<sup>2</sup>Laboratorio de Parasitología y Vectores, Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. Blvd. Valsequillo y Av. San Claudio Edificio BIO 1, Ciudad Universitaria Col. Jardines de San Manuel, C.P. 72570 Puebla, México.

\*Autor de correspondencia: cesar.sandoval@correo.buap.mx

#### RESUMEN

Se aplicó un cuestionario sobre agentes etiológicos, modos de transmisión, manifestaciones clínicas, prevención y tratamiento de las enfermedades transmitidas por artrópodos (Dengue, Paludismo, Enfermedad de Chagas, Leishmaniasis y Alacranismo) para evaluar el conocimiento y práctica de médicos y estudiantes de medicina del Hospital Universitario y Facultad de Medicina de la BUAP. Se obtuvieron valores bajos de conocimiento en modo de transmisión, manifestaciones clínicas y tratamiento. Los estudiantes mostraron un mejor conocimiento sobre las manifestaciones clínicas de Leishmaniasis con respecto a médicos. Los factores independientes asociados a un conocimiento/práctica adecuada en médicos fueron: edad, grado de escolaridad y egreso; en estudiantes para un conocimiento adecuado fueron edad y cuatrimestre/semestre. Los resultados indican un área de oportunidad para mejorar los programas de estudio a nivel licenciatura y tratamiento de pacientes a nivel hospitalario.



**Palabras clave:** Conocimiento, Práctica, Médicos, Estudiantes de medicina, Entomología médica.

## INTRODUCCIÓN

El concepto de enfermedades transmitidas por vectores (ETV) se ha circunscrito a solo aquellas enfermedades en que intervienen artrópodos, tales como mosquitos (Culicidae), jejenes (Simuliidae), flebótomos (Phlebotominae), chinches besuconas (Triatominae), garrapatas (Ixodidae), alacranes (Scorpionida) (Secretaría de Salud, 2001). Las ETV generan un gran impacto a nivel mundial y son amenaza importante para la salud pública (Hill *et al.*, 2005) ya que más del 60% de la población mundial está en riesgo de contraer estas enfermedades sólo por habitar en áreas tropicales y subtropicales (Wichmann *et al.*, 2007). En el continente americano entre las enfermedades transmitidas por vectores más importantes se tienen al Dengue, Paludismo, Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana), Leishmaniasis y Alacranismo (Arenas *et al.*, 2015).

México presenta un grado alto de endemismo para Dengue, Paludismo, Tripanosomiasis americana, Leishmaniasis y Alacranismo. Entre los años 2013 al 2019 se reportaron 226,981 casos para Dengue, 4,721 de Paludismo, 6,384 de la Enfermedad de Chagas, 4,205 de Leishmaniasis y 2,110,018 de Alacranismo (Secretaría de Salud, 2019). Por la alta prevalencia de las ETV, se han realizado varios estudios para determinar el conocimiento y práctica a distintas comunidades en riesgo (Wasnik y Mehta, 2017), en donde el conocimiento es un componente cognoscitivo, donde se incluyen dos factores fundamentales: la realidad y todo el conocimiento previo que posee quien percibe un estímulo y además se encuentra almacenado en su mente. La práctica es un componente conductual que se define como la objetivación de las actitudes y conocimiento que se manifiesta mediante la acción de una persona sobre su objeto actitudinal (Vargas, 2005).

El instrumento de mayor efectividad para valorar el conocimiento y práctica, son los cuestionarios, estos han sido ampliamente utilizados para la caracterización de comunidades, en la evaluación de intervenciones y/o en la descripción de las condicionantes eco-bio-

sociales de riesgo (Castro *et al.*, 2010). Los cuestionarios de conocimientos y prácticas son un estudio cuantitativo de una población específica que reúne información sobre lo que la gente sabe y cómo se comporta con relación a un tema en específico (Holman, 2012). Una de las comunidades que se ha evaluado el conocimiento y práctica han sido los médicos, debido a que presentan bajos valores para la práctica clínica de diversas enfermedades transmitidas por vectores principalmente en el manejo, diagnóstico, tratamiento y prevención (Alzahrani, 2015; Rafique *et al.*, 2015; Lugo-Caballero *et al.*, 2017; Thaver *et al.*, 2011; Tomashek *et al.*, 2014). Los estudiantes de las ciencias médicas presentan bajos valores en el conocimiento para la transmisión y prevención de ETV (Bota *et al.*, 2014; Patil *et al.*, 2015; Saberi *et al.*, 2012).

Por lo anterior y debido a la relevancia de un reconocimiento temprano, la comprensión de los problemas clínicos que se presentan en las diferentes fases de estas enfermedades, además de conseguir buenos resultados clínicos. Es fundamental evaluar el conocimiento y práctica de los médicos y estudiantes de medicina respecto a estas enfermedades transmitidas por artrópodos, para detectar deficiencias y fortalezas que permitan mejorar los programas de estudio a nivel licenciatura, diagnóstico y tratamiento de pacientes a nivel hospitalario.

## **PROCEDIMIENTO Y PARTICIPANTES**

Se elaboró un cuestionario considerando agentes etiológicos, modo de transmisión, manifestaciones clínicas, prevención y tratamiento de las enfermedades transmitidas por artrópodos (Dengue, Paludismo, Enfermedad de Chagas, Leishmaniasis y Alacranismo). Estas enfermedades son abordadas en los planes de estudios de todas las escuelas de medicina en México (Lugo-Caballero *et al.*, 2017). La información sociodemográfica incluida fue Estado de procedencia, edad, grado de escolaridad, especialidad (en el caso de estudiantes: cuatrimestre/semestre), escuela o facultad de procedencia. Además, se le agrego preguntas sobre zoonosis, reservorio y Rickettsiosis, con un total de 55 preguntas. Para la elección de los médicos fue ser interno o residente del Hospital Universitario de Puebla-BUAP, para los estudiantes que estuvieran entre el quinto y décimo cuatrimestre/semestre, con las materias aprobadas de Microbiología y Virología, Parasitología y

Micología de la Facultad de Medicina BUAP. Se les hizo mención del propósito, confidencialidad y anonimato del cuestionario a los participantes. Se aplicó el cuestionario sobre las enfermedades transmitidas por artrópodos, a 46 médicos en abril del 2017, 54 médicos en marzo del 2019, en el Hospital Universitario de Puebla (BUAP) con un total de 100 médicos y 100 estudiantes de la Facultad de Medicina (BUAP) realizados en enero del 2019. Se solicitó la aprobación del Comité de Investigación y Ética de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, autorizado con el número de registro institucional CEIHUP2019/018.

### **Análisis de datos**

Los datos fueron separados por enfermedad (Dengue, Paludismo, Enfermedad de Chagas, Leishmaniasis y Alacranismo) para su análisis. Para el procesamiento de la información se elaboraron bases de datos en EXCEL, el análisis descriptivo de las características sociodemográficas y tablas de frecuencia para las respuestas se usó Statistica Versión 7 (StatSoft, Inc. 2004). Se realizó la prueba t de student, en donde se utilizó la información procedente de las medias y desviaciones estándar (medidas resumen) de cada uno de los grupos de estudio. Con esta prueba se realizó comparaciones entre las poblaciones de médicos y estudiantes, con las medias de los porcentajes correctos de patógenos y modo de transmisión, manifestaciones clínicas, prevención de la infección y tratamiento, separados por enfermedad. Se ajustó el modelo de regresión logística para establecer las asociaciones entre el conocimiento / práctica y las variables sociodemográficas. A cada respuesta correcta se le asignó el valor "1", respuestas incorrectas "0", además a cada participante se le asignó un valor de Conocimiento y Práctica, la escala para el conocimiento fue de 0 a 26 puntos, dicotomizados a "inadecuado" de 0 - 13 puntos, "adecuado" de 14 a 26 puntos. La escala para la práctica fue de 0 a 24 puntos, "inadecuado" de 0 - 12 puntos, "adecuado" de 13 - 24 puntos. Se calculó la razón de probabilidades (odds ratio), con sus respectivos intervalos de confianza del 95% para cada una de las asociaciones, todas las pruebas se consideró un nivel de significancia de 0,05. Las comparaciones y asociaciones se realizaron en SPSS versión 18 (SPSS Inc. Released 2009).

## RESULTADOS

### Agentes etiológicos y modo de transmisión

El 91% de médicos y 88% de estudiantes identificaron correctamente los posibles modos de transmisión del Dengue (vía vectorial); el 41% de médicos y 36% de estudiantes identificaron el número correcto de serotipos del virus del Dengue (Arenas *et al.*, 2015). Con respecto a las especies transmisoras del Dengue el 46% de médicos y 36% de estudiantes reconocieron a *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* correctamente. El 91% de médicos y 92% estudiantes reconocen los posibles modos de transmisión del paludismo (vía vectorial y vía transfusional); médicos con un 73% y 67% de estudiantes identificaron las especies de *Plasmodium* causantes de paludismo en México (*Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*). Para los géneros de mosquitos transmisores de los agentes causales de paludismo (*Anopheles*) el 68% de médicos y 67% estudiantes seleccionaron la respuesta correcta. *Anopheles albimanus* y *Anopheles pseudopuntipennis* fueron reconocidos como las especies principales de mosquitos transmisores por el 43% de los médicos y 44% de estudiantes.

La vía de adquisición más frecuente de la enfermedad de Chagas es la contaminativa deyección – paciente siendo reconocida por el 63% de médicos y 48% estudiantes. Solo a los participantes pertenecientes del estado de Puebla se les indicó que seleccionarán a las especies de insectos transmisores de la enfermedad de Chagas en el estado donde el 27% en ambos grupos las identificó correctamente (*Triatoma dimidiata*, *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma barberi*, *Triatoma bassolsae*). El 54% de médicos y 51% estudiantes identificaron correctamente a los agentes etiológicos de las diferentes manifestaciones clínicas de leishmaniasis en México (*Leishmania mexicana*, *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania chagasi*, *Leishmania donovani*). Para las especies de insectos transmisores de leishmaniasis en México (*Lutzomyia olmeca*, *Lutzomyia shannoni*, *Lutzomyia cruciata*, *Lutzomyia diabólica*) con el 21% en médicos y 20% estudiantes las seleccionaron correctamente. Tan solo el 36% de médicos y 33% estudiantes respondieron correctamente a ¿Qué es alacranismo o IPPA? (La intoxicación por picadura de alacrán), las especies de alacranes

más importantes desde el punto de vista epidemiológico en los estados de procedencia de los participantes fueron: *Centruroides noxius* (37% médicos, 24% estudiantes), *Centruroides elegans* (22% médicos, 31% estudiantes), *Centruroides limpidus* (22% médicos, 15% estudiantes).

## **MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

Para la pregunta ¿Cuál número de episodio de infección por Dengue puede tener mayores consecuencias? el 57% de médicos y 54% estudiantes respondieron correctamente (Segunda infección con diferente serotipo al del primer episodio). El 54% de los médicos y 51% estudiantes seleccionaron de forma adecuada las manifestaciones clínicas. Las complicaciones de un paciente con cuadro palúdico (hepatopatía) fueron reconocidas por el 31% de médicos y 33% estudiantes. El 33% de médicos y 32% estudiantes identificaron los síntomas de la etapa aguda de la enfermedad de Chagas (Fiebre, abatimiento, vómitos, diarrea, tos, palpitaciones, cefaleas). Médicos con un 65% y estudiantes 68% seleccionaron correctamente las complicaciones de un paciente con cuadro chagásico crónico (trastornos del ritmo cardiaco (BRDHH, bloqueo AV, extrasístoles ventriculares, taquiarritmias o bradiarritmias), megacolon, tromboembolia cerebral). El 43% de médicos y 58% estudiantes seleccionaron correctamente las distintas manifestaciones clínicas de la leishmaniasis (cutánea localizada, cutánea difusa, mucocutánea, visceral). El 50% de los médicos y 40% estudiantes seleccionaron de manera adecuada dolor intenso o prurito inmediato en el sitio de picadura, parestesias locales y ocasionalmente, edema e hiperemia mínima como la sintomatología del cuadro clínico leve de un paciente sospechoso de intoxicación por picadura de alacrán.

### **Prevención de la infección**

El 88% de médicos y 87% de los estudiantes seleccionaron las medidas preventivas adecuadas para Dengue (Erradicar estancamientos de agua, uso de repelentes y mosquiteros). Los factores de riesgo para contraer Dengue (Carencia de servicio de agua potable) el 8% de médicos y 12% estudiantes las identificó correctamente. El uso de repelentes, mosquiteros tratados con insecticidas, son los métodos sugeridos para evitar contraer paludismo por un 53% de médicos y 50% estudiantes. La

ausencia de pabellones en dormitorios y hacinamiento fueron elegidos como los factores de riesgo para contraer paludismo por el 28% de médicos y 26% estudiantes. El 23% de médicos y 27% estudiantes reconocieron los factores que no son de riesgo para contraer la enfermedad de Chagas (tamizaje *anti T. cruzi* en donadores de sangre). Considerando sólo a los participantes del estado de Puebla se les pidió identificar la región del estado con la mayor seroprevalencia de donadores de sangre a la enfermedad de Chagas donde solo el 42% de médicos y 41% estudiantes la identificaron correctamente (Mixteca). El 64% de médicos y 71% de estudiantes recomiendan a sus pacientes los siguientes métodos para evitar contraer la enfermedad de Chagas (eliminar los pisos de tierra en la vivienda, revocar grietas de las paredes, aseo periódico de dormitorios y evitar hacinamiento). Los médicos con 85% y 93% estudiantes sugieren el uso de repelentes, sacrificar mamíferos con improntas positivas, usar cortinas y mosquiteros impregnados con insecticidas, usar cortinas y mosquiteros impregnados con pesticidas para evitar contraer leishmaniasis. Los factores de riesgo para contraer leishmaniasis identificados por médicos y estudiantes fueron animales domésticos pernoctando en la casa habitación, actividades agrícolas y ganaderas, marginación y marginación socioeconómica con el 57% en ambos grupos. El 82% de médicos y 88% estudiantes seleccionaron correctamente que actividades como agricultura y albañilería, viviendas rústicas, falta de higiene domiciliaria, clima tropical como factores de riesgo para contraer intoxicación por picadura de alacrán.

### **Tratamiento**

Al atender a un paciente con Dengue el 38% de médicos y 28% estudiantes lo ingresará a atención hospitalaria. El 60% de los médicos y 45% de estudiantes prescribirá el medicamento adecuado para el manejo de un paciente con Dengue (Paracetamol), el resto prescribirá medicamentos contraindicados como antibióticos, aspirina, ibuprofeno e indometacina. El 61% de médicos y 56% estudiantes consideran gota gruesa como una de las pruebas de diagnóstico rápidas para confirmar un caso palúdico, Cloroquina + Primaquina es el tratamiento recomendado para pacientes con cuadro palúdico por *P. falciparum* siendo elegido por el 57% de médicos y 48% estudiantes. El tratamiento para un cuadro

palúdico por *P. vivax* es Cloroquina del cual 64% de médicos y 72% estudiantes respondieron adecuadamente. El tratamiento recomendado cuando se presenta resistencia de *P. vivax* a Cloroquina es Quinina, el 21% de médicos y 8% estudiantes lo identificaron.

De los médicos solo el 34% y el 43% estudiantes seleccionaron las pruebas de confirmación diagnóstico parasitológicas para la enfermedad de Chagas (ELISA, PCR). El 58% de médicos y 48% estudiantes seleccionaron el tratamiento recomendado para pacientes en fase aguda de la enfermedad de Chagas (Nifurtimox (8-16 mg/kg/día, 60 días), Benzanidazole (5-7mg/kg/día, 60 días). El tratamiento recomendado para pacientes con leishmaniasis cutánea localizada es antimonio de meglumina, estibogluconato de sodio y termocirugía el cual fue seleccionado correctamente por el 40% de los médicos y 31% estudiantes. Las pruebas de diagnóstico que recomendarían los participantes en un caso sospechoso de leishmaniasis serían reacción de Montenegro o intradermorreacción con el 37% en el caso de médicos y 52% estudiantes. El tratamiento recomendado para pacientes con intoxicación por picadura de alacrán es faboterapia, diclofenaco y soluciones parenterales, el cual fue seleccionado adecuadamente por el 9% en ambos grupos. Para los medicamentos contraindicados en el tratamiento a pacientes con intoxicación por picadura de alacrán el 70% de médicos y 85% estudiantes seleccionaron las respuestas correctas (gluconato de calcio, atropina, ácido acetilsalicílico, corticosteroides, metamizol).

### **Comparaciones y asociaciones**

En Leishmaniasis, médicos y estudiantes de medicina no mostraron diferencias significativas en patógenos y modo de transmisión ( $P=0,938$ ), prevención ( $P=0,992$ ) y tratamiento ( $P=0,804$ ), pero para las manifestaciones clínicas, se presentó diferencias significativas entre participantes ( $P=0,019$ ) donde los estudiantes obtuvieron un mejor conocimiento.

De acuerdo con el análisis de regresión logística para determinar los factores independientes asociados; la edad, el grado de escolaridad y egreso fueron los únicos factores independientes asociados a un conocimiento y práctica adecuada en médicos ( $p=0.001$ ), para las enfermedades (Dengue, Paludismo, enfermedad de Chagas,

Leishmaniasis, IPPA). Los médicos que se encuentran en el rango de edad de los 28 a 30 años tienen mayor conocimiento (OR= 1.03, IC 95%= 0.34 – 3.09) que los que se encuentran en el rango de los 22 a 24 años (OR= 0.63, IC 95%= 0.1 – 3.78). Además, los residentes en su cuarto año tienen mayor conocimiento (OR= 0.66, IC 95%= 0.065 – 6.8) que los residentes en su segundo año (OR= 0.38, IC 95%= 0.045 – 3.32). Médicos que ya se titularon tienen mayor conocimiento (OR= 2.43, IC 95%= 0.64 – 9.21) que los que aún no se titulan (OR= 2.02, IC 95%= 0.56 – 7.3).

Médicos que se encuentran en el rango de edad de 28-30 años tienen una mejor práctica (OR=0.84, IC 95%=0.95 – 2.4) que los que se encuentran en el rango de edad de 22-24 años (OR=0.38, IC 95%=0.06 – 2.29), los residentes en su tercer año tienen mayor práctica (OR=1.0, IC 95%=0.108 – 9.22) que los residentes en su primer año (OR=0.205, IC 95%= 0.025 – 1.67). Los médicos que ya se titularon tienen mayor práctica (OR=1.44, IC 95%= 0.37 – 5.56) con respecto a los que aún no se titulan (OR=0.48, IC 95%=0.09 – 2.38).

Para los estudiantes de medicina los factores independientes asociados a un conocimiento adecuado sobre las enfermedades (Dengue, Paludismo, enfermedad de Chagas, Leishmaniasis, IPPA), fueron la edad y el cuatrimestre/semestre ( $p=0.000$ ). Los estudiantes en el rango de edad de 23-25 años tienen mayor conocimiento adecuado (OR=1.27, IC 95%=0.322 – 5.06) que aquellos que se encuentran entre el rango de 20-22 años (OR=1.11, IC 95%= 0.082 – 15.03). Los alumnos que se encuentran cursando el décimo cuatrimestre/semestre tienen mayor conocimiento adecuado (OR=5.22, IC 95%=1.42 – 19.2) con respecto a los de séptimo cuatrimestre/semestre (OR=1.61, IC 95%=0.46 – 5.57). Para la práctica ningún factor estuvo asociado.

## DISCUSIÓN

Al evaluar el conocimiento de los participantes sobre las enfermedades se encontró que para patógenos y modo de transmisión había un conocimiento básico para dengue y paludismo. Con respecto a la Enfermedad de Chagas, a los participantes pertenecientes del estado de Puebla se les indicó que seleccionarían a las especies de insectos transmisores de la enfermedad en el estado, donde el 27% respondió correctamente, dato mucho menor a los registrados anteriormente en



Yucatán (México) y Almería (España) (Lugo-Caballero *et al.*, 2017; Muñoz-Vilches *et al.*, 2013). Está claro que su enseñanza no recibe suficiente atención en las escuelas de medicina. La mitad de los participantes conocen la vía de adquisición más frecuente de la enfermedad de Chagas dato similar a lo registrado anteriormente en el país (Lugo-Caballero *et al.*, 2017) y mayor a lo registrado en Estados Unidos (Stimpert y Montgomery, 2010), esto podría deberse a que EEUU no es un país endémico de la enfermedad sin embargo se han registrado cierto número de casos importados. Para Leishmaniasis en trabajos anteriores se registró que el 90% de los participantes sabían que la mosca de arena es un vector de leishmaniasis cutánea, pero solo el 28% podía identificarla (Ruoti *et al.*, 2013; Saberi *et al.*, 2012) valor similar a lo encontrado en este trabajo ya que el 20% de los participantes pudieron identificar a las especies de insectos transmisoras en México. El 60% selecciono a la respuesta ¿Qué es Alacranismo o IPPA? (Problema de salud pública, ocasionado por la picadura de alacranes en un grupo de personas, de determinada área), siendo errónea puesto que la respuesta correcta es (La intoxicación por picadura de alacrán), el concepto no ha quedado claro en su enseñanza pues aún existe una clara confusión.

Se identificaron brechas significativas con respecto a manifestaciones clínicas y tratamiento. Entre los problemas notables se incluyó que la mitad de los médicos y estudiantes prescribirían el medicamento adecuado (paracetamol) para el manejo de un paciente con dengue, el 5% de médicos como estudiantes prescribieron aspirina, sin tener en cuenta las actividades antitrombóticas del medicamento. Es posible que estos médicos no hayan considerado las consecuencias de una hemorragia masiva como resultado de la prescripción de aspirina. Además, el 10% de ellos recetaron antibióticos a pesar de que el dengue es una infección viral (Thaver *et al.*, 2011). Su conocimiento en manifestaciones clínicas era escaso solo la mitad de los médicos reconoce la fiebre como manifestación clínica del dengue, el 70% de médicos y estudiantes esperarían como manifestaciones (hemorragia no traumática y trombocitopenia) para la hospitalización de un paciente sospechoso de padecer dengue cuando lo correcto es que se hospitalice desde los primeros síntomas sin tener que llegar a parámetros de shock (Bota *et al.*,

2014; Lee *et al.*, 2011; Lugo-Caballero *et al.*, 2017; Rafique *et al.*, 2015; Thaver *et al.*, 2011; Tzong-Shiann *et al.*, 2013).

Se sabe que la malaria causa daño hepático en casos graves (Secretaría de Salud, 2014), sin embargo, solo el 30% de médicos y estudiantes consideran a la hepatopatía como una complicación de un paciente con cuadro palúdico. En cuanto al tratamiento recomendado para pacientes con cuadro palúdico por *P. falciparum* (53%) respondieron correctamente y por *P. vivax* (68%), valores similares a los registrados anteriormente (Thaver *et al.*, 2011). El 52% sigue el tratamiento recomendado para pacientes en fase aguda de la enfermedad de Chagas, siendo similar a lo obtenido en anteriores trabajos (Lugo-Caballero *et al.*, 2017; Muñoz-Vilches *et al.*, 2013). Solo el 35% de participantes eligieron el tratamiento recomendado para pacientes con leishmaniasis cutánea localizada, valor mucho menor a lo registrado anteriormente (Routi *et al.*, 2013; Saberi *et al.*, 2012), esto podría deberse a que uno de los países de trabajos anteriores forma parte los 6 países que albergan alrededor del 90% de pacientes con leishmaniasis cutánea (Saberi *et al.*, 2012). Un valor alarmante encontrado es que tan solo el 9% de los participantes indicarían el tratamiento recomendado para pacientes con intoxicación por picadura de alacrán, pues aproximadamente 300,000 casos son reportados cada año en nuestro país (Secretaría de Salud, 2014).

De acuerdo con lo mencionado anteriormente podemos decir que los participantes no han tomado en cuenta la NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores y la NORMA Oficial Mexicana NOM-033-SSA2-2011, Para la vigilancia, prevención y control de la intoxicación por picadura de alacrán. En donde se especifica el tratamiento correcto para dengue, paludismo, leishmaniasis, enfermedad de Chagas y alacranismo.

En trabajos anteriores al comparar el conocimiento, práctica y aptitudes de médicos con estudiantes de medicina para distintas enfermedades encontraron diferencias significativas entre grupos, en donde médicos mostraron tener mejor conocimiento y práctica para las distintas enfermedades (Allen *et al.*, 1992; Vanderhoek *et al.*, 2013; Wonkam *et al.*, 2006). Esto se atribuye a una mayor experiencia, cursos de educación médica y la lectura, por parte de médicos. En contraste con

nuestros resultados son diferentes, en la mayoría de las enfermedades el conocimiento y práctica es la misma entre ambos grupos a excepción de las manifestaciones clínicas de leishmaniasis donde se presenta mejor conocimiento en los estudiantes de medicina. Esto refleja una enseñanza ineficiente en las escuelas de medicina y una nula capacitación y actualización por parte de los médicos.

Las variables sociodemográficas predictoras de un buen conocimiento, práctica y aptitudes anteriormente registradas en médicos y estudiantes sobre distintas enfermedades transmitidas por vectores son: sitio de estudio, región, experiencia, género, nivel de educación, edad (Alobuia *et al.*, 2015; Benthem *et al.*, 2022; Fritzell *et al.*, 2016; Michael *et al.*, 2018; Routi *et al.*, 2013). Todos estos resultados en contraste con los registrados en este estudio (la edad, escolaridad y si se titularon o no); resultaron ser factores asociados a un conocimiento y práctica adecuada en médicos. En estudiantes los factores asociados a un buen conocimiento es la edad y el nivel de estudios (cuatrimestre/semestre).

Aunque México cuenta con procedimientos oficiales para el manejo y tratamiento de estas enfermedades, no recibe suficiente atención. Esta situación es preocupante, los médicos juegan un papel determinante para llegar a un diagnóstico y establecer un tratamiento oportuno a estas enfermedades altamente prevalentes. Los programas de capacitación y actualización a médicos son necesarios para mejorar la calidad de la atención médica brindada, reduciendo la morbilidad y mortalidad de las enfermedades con un tratamiento efectivo. El pobre conocimiento general y los puntajes de práctica requieren un mayor enfoque en las ETV en el plan de estudios médico, junto con docentes capacitados en ETV pues no se puede esperar que los estudiantes adquieran buenos conocimientos si estos no son transmitidos de manera adecuada.

## REFERENCIAS

- Allen, S. S., Harris, I. B., Kofron, P. M., Anderson, D. C., Bland, C. J., Dennis, T., *et al.* (1992). A comparison of knowledge of medical students and practicing primary care physicians about cardiovascular risk assessment and intervention. *Prev Med.*, 21, 436-448.

- Alobuia, W. M., Missikpode, C., Aung, M. y Jolly, P. E. (2015). Knowledge, attitude and practices regarding vector-borne diseases in Western Jamaica. *Ann Glob Health*, 81(5), 654-663.
- Alzahrani, A. (2015). Knowledge and practice of primary health-care physicians regarding the dengue fever in Makkah Al-Mokarramah city. *Int J Med Sci Public Health*, 4, 266-274.
- Arenas, M. L., Piña, P. M. y Gómez, D. H. (2015). Aportes y desafíos del enfoque de género en el estudio de las enfermedades transmitidas por vector. *Salud Publica Mex*, 57, 66-75.
- Bentham, H. B., Khantikul, N., Panart, K., Kessels, P. J., Somboon, P. y Oskam, L. (2002). Knowledge and use of prevention measures related to dengue in northern Thailand. *Trop Med Int Health*, 7, 993-1000.
- Bota, R, Ahmed, M., Jamali, M. S. y Aziz, A. (2014). Knowledge, attitude and perception regarding dengue fever among university students of interior Sindh. *J Infect Public Health*, 7, 218-223.
- Castro, P. M., Gálvez, M. C., Sánchez, V., Pérez, D., Polo, D. V., Concepción, D, *et al.* (2010). Encuesta poblacional sobre conocimiento y percepciones acerca de dengue contra prácticas preventivas en el municipio Lisa. *Rev Cubana Med Trop*, 62, 245-53.
- Fritzell, C., Raude, J., Adde, A., Dusfour, I., Quenel, P. y Flamand, C. (2016). Knowledge, attitude and practices of vector-borne disease prevention during the emergence of a new arbovirus: implications for the control of Chikungunya virus in French Guiana. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, e0005081.
- Hill, C. A., Kafatos, F. C., Stansfield, S. K. y Collins, F. H. (2005). Arthropod-borne diseases: vector control in the genomics era. *Nat Rev Microbiol*, 3, 262-268.
- Holman, A. (2012). Encuestas de conocimientos, actitudes y prácticas en el ámbito de la protección de la infancia: guía detallada para el diseño e implementación de métodos de encuestas de conocimientos, actitudes y prácticas para programas de protección de la infancia. Iniciativa de Protección de la Infancia, Save the Children
- Lee, L. K., Thein, T. L., Kurukularatne, C., Gan, V. C., Lye, D. C. y Leo, Y. S. (2011). Dengue knowledge, attitudes, and practices among primary care physicians in Singapore. *Ann Acad Med Singapore*, 40, 533-538.

- Lugo-Caballero, C. I., Dzul-Rosado, K., Dzul-Tut, I., Balam-May, A. y Zavala-Castro, J. (2017). Knowledge of vector-borne diseases (dengue, rickettsiosis and Chagas disease) in physicians. *Gac Med Mex*, 153, 292-298.
- Michael, G. C., Grema, B. A., Aliyu, I., Alhaji, M. A., Lawald, T. O., Ibrahime H, *et al.* (2018). Knowledge of venomous snakes, snakebite first aid, treatment, and prevention among clinicians in northern Nigeria: a cross-sectional multicentre study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 112, 47-56.
- Muñoz-Vilches, M. J., Salas-Coronas, J., Gutiérrez-Izquierdo, M. I., Metz, D., Salvador-Sánchez, J. y Giménez-Sánchez, F. (2013). Conocimiento de la enfermedad de Chagas por parte de los profesionales sanitarios de tres hospitales en la provincia de Almería. *Rev Esp Salud Publica*, 87, 267-75.
- Patil, R. S., Bogam, R. R., Gothankar, J. S. y Sane, S. (2015). Educational intervention: A useful tool for assessing knowledge of medical students regarding national vector borne disease control programme. *SEAJME*, 9, 41-45.
- Rafique, I., Saqib, M. A., Siddiqui, S., Munir, M. A., Malik, I. A., Rao, M. H, *et al.* (2015). Dengue knowledge and its management practices among physicians of major cities of Pakistan. *J Pak Med Assoc*, 65, 392-396.
- Ruoti, M., Oddone, R., Lampert, N., Orué, E., Miles, M. A., Alexander, N, *et al.* (2013). Mucocutaneous leishmaniasis: knowledge, attitudes, and practices among paraguayan communities, patients, and health professionals. *J. Trop. Med*, 2013, 538629.
- Saberi, S., Zamani, A., Motamedi, N., Nilforoushzadeh, M. A., Jaffary, F., Rahimi, E, *et al.* (2012). The knowledge, attitude, and prevention practices of students regarding cutaneous leishmaniasis in the hyperendemic region of the Shahid Babaie Airbase. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12, 306-309.
- Secretaria de Salud. (17 de febrero de 2019). *Manual técnico de tratamientos médicos para el programa de paludismo 2014*. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/38281/manual\\_tratamientos\\_paludismo.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/38281/manual_tratamientos_paludismo.pdf)

- Secretaría de Salud. (15 de agosto de 2018). Programa de acción: enfermedades transmitidas por vector 2001. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/vectores.pdf>
- Secretaría de Salud. (7 enero de 2020). Vigilancia epidemiológica semana 52. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2019. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/522437/BSEMAN\\_AL\\_52.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/522437/BSEMAN_AL_52.pdf)
- Stimpert, K. K. y Montgomery, S. P. (2010). Physician awareness of Chagas disease, USA. *Emerg Infect Dis*, 16, 871-2.
- Thaver, A. M., Sobani, Z. A., Qazi, F., Khan, M., Zafar, A. y Beg, M. A. (2011). Assessing the need for training: general practitioners' knowledge, attitude and practice concerning dengue and malaria in Karachi, Pakistan. *Int Health*, 3, 126-130.
- Tomashek, K. M., Biggerstaff, B. J., Ramos, M. M., Guerra, C. L., Rivera, E. J. y Sun, W. (2014). Physician survey to determine how dengue is diagnosed, treated and reported in Puerto Rico. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e3192.
- Tzong-Shiann, H., Mei-Chih, H., Shih-Min, W., Hsian-Chou, H. y Ching-Chuan, L. (2013). Knowledge, attitude, and practice of dengue disease among healthcare professionals in southern Taiwan. *J Formos Med Assoc*, 112, 18-23.
- Vanderhoek, A. J., Hammal, F., Chappell, A., Wild, T. C., Raupach, T. y Finegan, B. A. (2013). Future physicians and tobacco: an online survey of the habits, beliefs and knowledge base of medical students at a Canadian University. *Tob Induc Dis*, 11, 1-9.
- Vargas, R. (2005). Proyecto Integrado: La salud sexual y la salud reproductiva de la población estudiantil de la Universidad Nacional. Instituto de Estudios Sociales en Población (IDESPO).
- Villa-Manzano, A. I., Vázquez-Solís, M. G., Zamora-López, X. X., Arias-Corona, F., Palomera-Ávila, F. M., Pulido-Galaviz, C, *et al.* (2016). Alacranismo severo causante de parálisis flácida aguda. Reporte de caso. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 54, 268-8.
- Wasnik, S. y Mehta, A. (2017). Awareness, knowledge and practices about mosquito borne diseases in patients of tertiary care hospital in Navi Mumbai. *Int J Community Med Public Health*, 4, 3673-3677.

- Wichmann, O., Gascon, J., Schunk, M., Puente, S., Siikamaki, H., Gjorup, I., *et al.* (2007). Severe dengue virus infection in travelers: risk factors and laboratory indicators. *J Infect Dis*, 195, 1089–1096.
- Wonkam, A., Njamnshi, A. K., Angwafo, III. F. F. (2006). Knowledge and attitudes concerning medical genetics amongst physicians and medical students in Cameroon (sub-Saharan Africa). *Genet Med*, 8, 331-338.

## Capítulo 5

### **Toxoplasmosis. Una infección parasitaria grave en las poblaciones humanas en edad reproductiva**

*José Lino Zumaquero-Ríos\*, Jorge Sarracent Pérez*

Laboratorio de Parasitología y Vectores Facultad de Ciencias Biológicas Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

\*Autor de correspondencia: [jose.zumaquero@correo.buap.mx](mailto:jose.zumaquero@correo.buap.mx)

#### **RESUMEN**

La toxoplasmosis es una parasitosis que origina el parásito intracelular *Toxoplasma gondii* (Nicolle y Manceaux, 1908), la cual es comúnmente transmitida por gatos, aunque hay otras vías transmisión como la ingestión de carne de cerdo, verduras mal cocidas o lavadas, trabajo de jardinería, etc. Si se adquiere esta infección por primera vez durante el embarazo puede causar aborto en el primer trimestre del embarazo, sin embargo, si ocurre en el transcurso del embarazo provoca malformaciones al feto como daño ocular, al sistema nervioso central, entre otras, por lo cual su diagnóstico es de suma importancia, este se lleva a cabo por inmunoensayos como los ELISA para comprobar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, así como la avidéz para saber si es reciente o pasada la infección. El estudio de la Toxoplasmosis ha sido una preocupación permanente en medios domésticos y silvestres debido al vínculo que biólogos y veterinarios mantienen para con cachorros y pequeñas especies de animales. Muestra de ello son los estudios que se realizaron en 100 mujeres gestantes en la ciudad de Puebla; de las cuales 44 dieron positivas a la presencia de anticuerpos anti-*T.gondii*, dando a notar un desconocimiento de esta infección por la sociedad así como del personal de salud.



**Palabras clave:** Toxoplasmosis congénita , IgG , Urea, Factores de riesgo

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades zoonóticas (del griego zoon: animal) son un grupo de enfermedades infecciosas que se transmiten de los animales a los humanos, de forma directa o indirecta ya sea por los animales o los productos derivados de estos (por ejemplo, carne, leche, huevos) o su entorno (Reyes et al., 2011). Los agentes infecciosos involucrados incluyen bacterias, virus, parásitos, hongos y rickettsias, entre otros. Estas infecciones, según su ciclo, pueden ser clasificadas como sinantrópicas cuando tienen un ciclo urbano o exoantrópicas, cuando el ciclo es selvático ( Dabanch, 2003).

La toxoplasmosis es una infección parasitaria de tipo zoonosis de las más comunes en el mundo causada por el parásito intracelular obligado *Toxoplasma gondii* (Protozoa Apicomplexa). Aislado por primera vez por Charles Nicolle y Manceaux en 1908 a partir del hígado y bazo de un roedor africano llamado *Ctenodactylus gundii* (Martín y García, 2003). La infección por *T. gondii* causa una enfermedad benigna-asintomática con consecuencias muy graves, según el estado inmune del individuo que afecte (Alava y Flores, 2011).

La infección activa ocurre sólo una vez en la vida provocando inmunidad de manera permanente. Las mujeres que desarrollan inmunidad a la toxoplasmosis antes del embarazo no corren peligro de transmitir la infección al producto, sin embargo, ocurre lo contrario si se produce durante el embarazo (Jácome, 2007). Durante el primer trimestre de gestación se transmite en baja frecuencia al embrión, y puede ser causa de y malformaciones congénitas cuando el embarazo sigue su curso o aborto. Durante el segundo trimestre, la tasa de transmisión vertical aumenta y los fetos infectados suelen nacer prematuramente o con problemas graves, debido a que el parásito puede invadir cualquier tipo de célula nucleada. Los neonatos infectados desarrollan hepatoesplenomegalia, ictericia y eritrodermia. En el tercer trimestre del embarazo, la tasa de transmisión es de 50 a 80% pero la mayoría de los bebés nacen asintomáticos y a término. El gran problema de estos casos es que posteriormente desarrollan secuelas neurológicas, oftalmológicas

y auditivas en un tiempo que puede ser de tres meses a 20 años (Flisser, 2015).

La infección en un individuo con un buen sistema inmune estimula una respuesta innata seguida de una adaptativa humoral y celular, que restringe el crecimiento parasitario, por lo que la infección suele pasar inadvertida y autolimitarse. En la fase aguda hay producción de anticuerpos (Ac) de clase IgM e IgA (Martín y García, 2003). Algunas observaciones recientes indican que los anticuerpos IgM pueden durar hasta dos años, por lo que su presencia no siempre se liga a la fase aguda de la infección. La IgG aparece dos o tres semanas después de la IgM, persiste en bajos niveles de por vida, pues la parasitosis se mantiene por los quistes tisulares (Flisser, 2015).

Las características del medio ambiente influyen en la prevalencia, pues es mayor en regiones calientes y húmedas, pero más baja en climas secos y fríos. Los factores culturales tienen relación especial con este parásito, pues la costumbre de comer carne cruda o mal cocida y la de tener gatos en las casas favorecen la infección (Hernández y García, 2003).

*T. gondii* infecta varios tejidos, incluyendo el músculo esquelético, el intestino y el sistema nervioso. Su ciclo de vida incluye una fase intestinal (sexual) en gatos y otros felinos, y una fase extraintestinal (asexual) en felinos y no felinos. Esta fase extraintestinal se puede presentar en el hombre y en otras especies de sangre caliente, en quienes se manifiesta la enfermedad. Las personas se pueden infectar mediante la ingestión de carne mal cocida que contenga quistes de *T. gondii* y por la ingestión de oocistos a partir de heces de gatos infectados (Giraldo, 2008) (Figura 1).

La importancia sanitaria de la toxoplasmosis se da sobre todo en ciertos grupos de riesgo ya que la infección normalmente cursa de forma asintomática. Desde hace algunos años, *T. gondii* se asocia a cambios en el comportamiento y a algunas alteraciones psiquiátricas como la esquizofrenia (Berdión, 2015). Ocupando el primer lugar como causa de linfadenopatía, planteando problemas de diagnóstico diferencial con otros procesos; en segundo lugar, como germen oportunista en los pacientes inmunocomprometidos (pacientes con SIDA, pacientes trasplantados, etc.). Finalmente, es uno de los responsables de la infección congénita grave en el recién nacido, siendo la interpretación correcta de

los test serológicos en la mujer embarazada un asunto de gran importancia pues, a menudo, son los únicos datos disponibles para fundamentar el diagnóstico (Ianiro y Moscardi, 1996).

*T. gondii* es un protozoo parásito intracelular obligado, polixeno facultativamente heteroxeno, perteneciente al filo Apicomplexa. Su ciclo de vida comprende diferentes estadios (Instituto Nacional de Seguridad, Salud y Bienestar en el Trabajo, 2016).

Los apicomplejos son parásitos intracelulares obligados, capaces de moverse sobre un sustrato, de un modo muy peculiar, y que poseen estructuras especiales que les permiten acceder a las células del hospedador. Este mecanismo de invasión es un proceso activo, distinto de la fagocitosis y capaz de evitar la destrucción lisosomal. Su nombre se debe a que tiene una estructura llamada complejo apical que consiste en anillos anteriores asociados a un conoide, micronemas y roptrias, que sirve para la adhesión e invasión de huésped (Brusca, 2005).

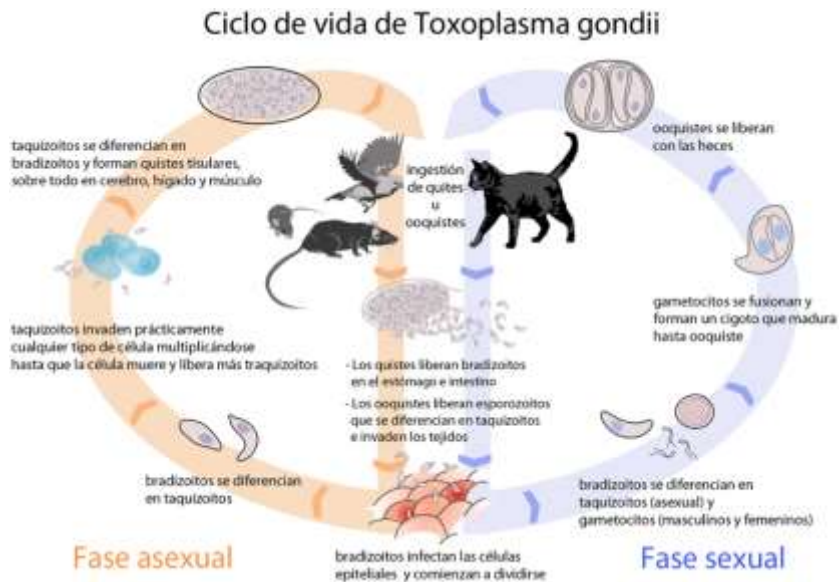


Figura 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Fuente: <https://curiosoando.com/como-es-el-ciclo-de-vida-de-toxoplasma-gondii>.

Su ciclo de vida comienza cuando el hospedador definitivo (felinos) ingiere el ooquiste esporulado que puede estar presente en el agua, en la vegetación o en carne cruda, al ingerir roedores o pájaros que tengan quistes tisulares (Giraldo, 2008). En el intestino del felino el parásito continúa su ciclo, este se pueden encontrar tres formas del parásito: los taquizoítos, los bradizoítos y gametos y nuevos ooquistes son liberados con las heces (Figura 1). En el exterior los ooquistes esporulan al cabo de 1 a 5 días (Instituto Nacional de Seguridad, Salud y Bienestar en el Trabajo, 2016).

En el hospedero intermedio, que puede ser prácticamente cualquier mamífero o algunas aves, el parásito se encuentra en dos estadios: taquizoíto y bradizoíto. La primera es la forma de replicación rápida; se localiza en muchos tipos de células nucleadas, pues la invade en un proceso que es independiente de la fagocitosis normal: el parásito se fija en la membrana celular e induce cambios en su superficie, penetra al interior a través de una unión membranosa móvil, formando así una vacuola parasitófora, cuya naturaleza peculiar evita la acción de los lisosomas, lo que favorece su multiplicación activa sin peligro de ser destruido. Las vacuolas pueden contener hasta 32 parásitos antes de romperse, liberándose así los parásitos que invaden nuevas células. Los taquizoítos (también llamados trofozoítos) se convierten en bradizoítos, formas más grandes, de multiplicación lenta, que progresivamente predomina en quiste tisulares que se considera un estadio de reposo del parásito. Los gametos solo ocurren en el intestino delgado del hospedador definitivo y da lugar a los ooblastos y posteriormente a los ooquistes, que se liberan con las heces, y contienen los esporozoítos, formas infectivas de los parásitos (Flisser, 2015).

### **MECANISMO DE PROPAGACIÓN Y TRANSMISIÓN**

Los mecanismos de propagación y la transmisión es directa por vía oral: la infección se adquiere por la ingestión de carne cruda o poco cocida que contenga quistes tisulares, o por la ingestión de ooquistes defecados en las heces de gatos parasitados y madurados en el ambiente. La contaminación de aguas u hortalizas por ooquistes, o la manipulación de tierra o plantas que estén en contacto con excrementos de gato, pueden

acarrear la contaminación de los alimentos crudos o la transmisión por vía oral, a través de las manos. Una vez ingeridos, la pared externa de quistes y ooquistes se rompe por digestión enzimática y las formas infecciosas del parásito son liberadas a la luz del intestino. A partir de aquí invaden rápidamente las células colindantes, donde se transforman en taquizoítos, que son las formas invasivas, pasando a la fase parasitemia, por diseminación. Cuando se desarrolla la respuesta inmunitaria, los taquizoítos libres disminuyen y se enlentece su multiplicación intracelular pasando, en el transcurso de unas semanas, de la fase proliferativa o aguda a la fase crónica, en la que algunos parásitos continuarán multiplicándose lentamente (bradizoítos) formando los quistes tisulares. *T. gondii* puede infectar prácticamente todos los tejidos del organismo, con posibilidad de diseminación generalizada (Sierra et al., 2018).

El consumo de carne cruda o mal cocida es una ruta de transmisión de toxoplasma, en ciudades desarrolladas se estima que provocan el 50% de infecciones y por carne de cerdo se considera un 41% en USA (Gisbert Algaba et al., 2018).

La carne de cerdo es una de las más consumidas, sin embargo se sabe que el 30% de los casos de toxoplasmosis son debido a esta carne (Gisbert Algaba et al., 2018).

Transmisión transplacentaria: se produce durante la fase parasitémica de la infección por toxoplasma. Tras la infección de la placenta, puede producirse la infección del feto. Diversos factores como el inóculo parasitario, la virulencia de la cepa y el estadio evolutivo de la placenta van a condicionar la posibilidad de una infección fetal, el tiempo que media entre ambos procesos y su gravedad (Sierra et al., 2018).

*T. gondii* se encuentra en todos los continentes excepto en la Antártida y algunas islas en el Pacífico y a lo largo de la costa de Centro América. Los seres humanos, generalmente, se infectan por consumo de carne con quistes (bradizoítos) viables (las temperaturas superiores a 60°C o inferiores a 20°C pueden destruirlos) u ooquistes esporulados que contaminan el medio. La serología demuestra una amplia variación en la prevalencia de infección en los distintos lugares del mundo y está relacionado con los factores que predisponen a la infección como la altitud, el clima, las costumbres culinarias o el nivel socioeconómico. Los

climas cálidos y secos tienen menor incidencia de toxoplasmosis que los templados y húmedos y las tasas decrecen con el aumento de altitud. Aproximadamente el 25-30% de la población mundial está infectada por *T. gondii*. La prevalencia varía ampliamente entre los distintos países (10-80%) e incluso dentro del mismo país o entre comunidades de la misma región (Berdión, 2015).

*T. gondii* es un parásito muy bien adaptado a sus múltiples hospederos pues raramente provoca problemas clínicos en seres humanos o animales inmunocompetentes. Esto se debe a que inmediatamente después de la infección por vía oral se desencadena una respuesta innata mediada principalmente por macrófagos y células Natural Killer (NK), que producen IL 12 (interleucina-12) e inician la destrucción de los taquizoítos y células infectadas. Estas células presentan los antígenos a los linfocitos TCD4+ y se inicia una respuesta inmunitaria predominante de tipo Th1 (T helper 1), en lo que se desencadena la producción de más IL-12 e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), los que aumentan la capacidad destructiva de macrófagos y NK, y estimulan a TCD8+ (citotóxicos); en conjunto con la producción de anticuerpos de clase opsonizantes, como la IgG2a en ratones (equivalente IgG1 en humanos), esta combinación de células y anticuerpos destruyen el parásito de replicación rápida. Algunos de los trofozoítos se diferencian a bradizoítos y permanecen enquistados en tejidos evadiendo la respuesta del hospedero de por vida. Concomitante, la respuesta es modulada por la aparición de citocinas de la vía Th2 que restringen la inflamación ocasionada por Th1. (Berdión, 2015).

La patogenia de la toxoplasmosis sintomática principalmente se debe a la incapacidad de controlar la replicación de los taquizoítos con la consecuente destrucción de células y tejidos en pocos días (García, 2014). En humanos el período de incubación de la infección es de 10 a 23 días después de la ingestión de carne contaminada, y de 5 a 20 días después de la exposición a gatos infectados (Centers for Disease Control and Prevention, CDC, 2005). En aquellos individuos inmunocompetentes que no llevan un embarazo, la infección con *T. gondii* por lo general es asintomática. Aproximadamente entre un 10 y un 20% de los pacientes desarrollan linfadenitis o un síndrome de gripe leve caracterizado por fiebre, malestar general, mialgia, dolor de cabeza, dolor de garganta,

linfadenopatía y exantema. En algunos casos, la enfermedad puede imitar la mononucleosis infecciosa. Los síntomas a menudo se resuelven sin tratamiento entre algunas semanas o meses, aunque algunos casos pueden llevar hasta un año. Los síntomas graves, incluidos miositis, miocarditis, neumonitis y signos neurológicos, tales como parálisis facial, alteraciones graves de los reflejos, hemiplejía y coma, son posibles pero poco frecuentes. En adolescentes y adultos jóvenes, se puede observar la toxoplasmosis ocular con uveítis, por lo general unilateral; este síndrome es a menudo el resultado de una infección congénita asintomática o el resultado retrasado de una infección posnatal (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2005). En individuos inmunodeprimidos, la toxoplasmosis es una infección oportunista con consecuencias fatales como neumonitis, miocarditis y encefalitis. (Instituto Nacional de Seguridad, Salud y Bienestar en el Trabajo, 2016).

La toxoplasmosis es una zoonosis cuya frecuencia a nivel mundial, varía según las condiciones ambientales, hábitos culturales y especies animales con las que se convive. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura, FAO, y la Organización Mundial de la Salud, OMS, consideran a la toxoplasmosis como el cuarto riesgo más importante en parasitemias transmitidas por alimentos (Martínez y Palomeque, 2015).

La frecuencia de toxoplasmosis congénita va a variar de acuerdo algunos factores, de ellos la región geográfica, juega un papel importante, encontrándose que las tasas de prevalencia más elevadas se han registrado a nivel de Europa, América Central, Sudamérica y África Central. La prevalencia en base a pruebas serológicas en lactantes, varía desde 1 por 1.000 nacidos vivos en América Latina a 1 por cada 10.000 nacidos vivos en Estados Unidos (Martínez y Palomeque, 2015).

En México, la prevalencia es de alrededor de 40%, pero hay regiones en la costa del Golfo de México y la península de Yucatán con prevalencia mayor a 70%. Más o menos dos de cada mil recién nacidos en la Ciudad de México presentan toxoplasmosis congénita; si esto es similar en otras partes del país, nacen alrededor de 4000 niños infectados al año, la mayoría subclínicos y con probabilidad de desarrollar secuelas (Correa, 2017).

La toxoplasmosis afecta la retina y los coroides, causando retinocoroiditis que es la manifestación más común de la toxoplasmosis

ocular (Kaye, 2011). La retinocoroiditis es una uveítis posterior que se traduce en la inflamación de la úvea o capa media del globo ocular, encargada, entre otras funciones, de suministrar sangre a la retina o membrana interior del ojo; provoca una lesión en el pigmentario macular con una necrosis en la retina (Kaye, 2011).

### **Toxoplasmosis del sistema nervioso central**

Se presenta en infantes con toxoplasmosis congénita lo cuales presentan convulsiones, lagrimeo anormal en los ojos, nistagmo (movimiento involuntario de los ojos), estrabismo, retraso mental pérdida auditiva neurosensorial (Kaye, 2011).

Algunas medidas preventivas son: 1) control higiénico sanitario de los animales y de las materias primas: carnes, vegetales y agua, 2) instalaciones de trabajo adecuadas con superficies lisas de fácil limpieza y desinfección, 3) disponibilidad de agua corriente, lavabos, jabón y material para el secado, 4) vestuarios y lugares adecuados para guardar el equipo de protección y la ropa contaminada, 5) implementar programas de control de vectores: desratización, desinsectación, 6) manipulación y eliminación adecuada de residuos (excrementos de los gatos), 7) correctas medidas de higiene en el puesto de trabajo: lavado frecuente de manos, después del contacto con animales o materiales contaminados , después de quitarse los guantes, antes de las comidas y al final de la jornada y 8) utilización de ropa de trabajo y equipos de protección individual (Instituto Nacional de Seguridad, Salud y Bienestar en el Trabajo, 2016).

El diagnóstico sirve para evaluar una condición, analizando diversos datos, por lo que un diagnóstico serológico es la detección de antígenos o anticuerpos específicos de un individuo para conocer si existe una infección causada por cualquier microorganismo, además permite saber si es aguda o crónica. El criterio básico de diagnóstico sugiere la detección de Ac IgM e IgG en la embarazada en el primer trimestre o en pacientes inmunocomprometidos, y hacer seguimiento con los Ac IgG para ver probables variaciones de título y la seroconversión, o directamente para detectar inmunidad ya adquirida (Besteiro, 2008).

Los métodos serológicos utilizados son variados, pudiendo mencionarse la reacción de Sabin Feldman, test de fijación de



complemento, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta, ELISA y quimioluminiscencia (Besteiro, 2008). La presencia de anticuerpos anti nucleares y factores reumatoideos que dan lugar a reacciones falsas positivas, obligaron a usar artificios de absorción para poder tener resultados aceptables (Besteiro, 2008).

Los ensayos inmunológicos son procedimientos en los cuales se utilizan anticuerpos como reactivos enlazantes “específicos”. Teniendo aplicación universal para la determinación o cuantificación de fármacos terapéuticos y no terapéuticos, diversas sustancias biológicas, sustancias infecciosas o anticuerpos de respuesta del huésped en el suero, en la orina, en el líquido cefalorraquídeo en saliva y en cualquier líquido biológico donde se encuentre la sustancia a investigar (Guzmán, 2004).

Se han desarrollado varios métodos serológicos para la detección de parásitos, siendo el ensayo inmunoenzimático (ELISA) el más sensible y más utilizado. Este es un método diagnóstico sencillo y rápido que posibilita la realización de estudios epidemiológicos permitiendo obtener resultados cuantitativos y estableciendo distintos valores de positividad para diferentes grupos poblacionales (Quintana, 2000).

El aislamiento, la identificación y la purificación de antígenos específicos han permitido desarrollar varios sistemas de ELISA, que tienen una sensibilidad y especificidad clínica superior al 90% y su valor ya ha sido comprobado en investigaciones seroepidemiológicas (Quintana, 2000).

La aplicación de la prueba ELISA para la determinación de anticuerpo de *T. gondii* en suero de mujeres es de importancia, ya que la toxoplasmosis es una zoonosis de amplia distribución mundial, cuya frecuencia de presentación varía mucho según las zonas geográficas, el nivel socioeconómico y los hábitos alimenticios de la población. Además, es una de las enfermedades que reporta altos índices de morbimortalidad, lo cual ha motivado a muchos investigadores a realizar estudios inmunológicos encaminados hacia el diagnóstico temprano de este evento (Cortez y Mancera, 2009).

Se reconoce como avidéz a la fuerza de afinidad que existe entre la IgG específica y el epítipo de la proteína de *T. gondii*. A pesar de la existencia de marcadores de infección aguda como IgM o IgA, la persistencia de ellos hasta por dos años, luego de ocurrida la infección,

hace que la interpretación y evaluación de riesgo de transmisión durante el embarazo sea incierta. Una alternativa es medir la avidéz funcional del antígeno y del anticuerpo, lo que permite estimar el tiempo de adquisición de la infección, permitiendo diferenciar una infección aguda o primaria de una crónica (Torres y Gómez, 2008).

El procedimiento técnico es muy sencillo; consiste en un enzimoimmunoanálisis donde el suero del paciente se diluye y se procesa por duplicado en paralelo, una de las muestras es tratada en uno de los pasos con diluyente sólo (N° 1) y la otra con un reactivo disociante (N° 2) (urea en solución buffer), el cual cumplirá la función de “despegar” el Ac IgG del antígeno presente en el pocillo del ELISA. Si hay Ac IgG de toxoplasmosis reciente, su propiedad de baja avidéz (Besteiro, 2008).

La toxoplasmosis congénita sigue siendo un problema de salud pública, debido a que no se le presta suficiente atención (Alvarado et al., 2017). La expresión clínica orienta al diagnóstico de *Toxoplasma congénita*, sin embargo, muchos neonatos son asintomáticos, los cuales pueden desarrollar complicaciones durante su vida, principalmente pérdida de la visión (hasta 95%). Otras complicaciones pueden aparecer, como hidrocefalia, coriorretinitis, retardo mental, pérdida auditiva entre otras. Por todo ello, es un problema de salud pública complejo, no resuelto, y que se ha complicado aún más con la llegada del virus Zika a Latinoamérica. Este, desvió la atención durante 2015-2016; siendo causante de infección congénita y compromiso neurológico grave similar a toxoplasmosis. El impacto ha sido mayor en Brasil y Colombia, países con una carga importante de toxoplasmosis. En Colombia, se estima una letalidad cercana al 20%. Infortunadamente durante la epidemia de Zika, donde se investigó y asoció a este con microcefalia y otras alteraciones neurológicas, no fue explorado el estado serológico para *T. gondii* en muchos casos, condición que clínicamente es similar a Zika (microcefalia y calcificaciones cerebrales). Por ello, deben existir medidas para prevenir esta infección perinatal. El riesgo debe evaluarse con serologías en embarazadas con adecuada interpretación de estas (Alvarado et. al, 2017).

Es importante determinar IgG e IgM de forma simultánea y analizar cuidadosamente, para poder determinar si la condición es aguda o pasada. En ocasiones, es necesario realizar pruebas de avidéz para

toxoplasma, para orientar si la infección si es aguda o previa al embarazo. En recién nacidos idealmente el diagnóstico inmunológico y especialmente molecular, disponible hoy en día en muchos centros de referencia, ayuda a confirmar o descartar la infección. Es importante realizar la determinación de IgG e IgM en los niños asintomáticos, a fin de descartar la infección o iniciar tratamiento (Alvarado et. al, 2017).

Diferentes estudios han mostrado la asociación de *T. gondii* con trastornos neurológicos y enfermedades mentales. Se han encontrado quistes de *T. gondii* en todo el cerebro, por ejemplo, en el hipocampo, amígdala, cerebelo, corteza cerebral, ganglio basal, tallo cerebral y bulbo olfatorio, además de una variedad de células cerebrales como la microglía, neuronas y principalmente astrocitos (Fabiani et al., 2015).

La esquizofrenia es un desorden neuropsiquiátrico, crónico que afecta aproximadamente al 1% de la población del mundo, dañando las relaciones afectivas y cognoscitivas, afectando a adolescentes y jóvenes adultos. Se ha estudiado su relación con agentes patógenos, por ejemplo, la infección por el virus de la rubéola o coxsackievirus durante la gestación o neonatos incrementa el riesgo de padecer esquizofrenia. Recientemente se ha asociado a *T. gondii* con síntomas neuropsiquiátricos ya que este causa daños al sistema nervioso central (Awatef, 2016). Debido a la alta afinidad de *T. gondii* con el tejido nervioso (predominantemente las células de la glía - astrocitos) y la asociación establecida con trastornos cerebrales innatos, se le prestó mayor atención a una posible correlación (Fuglewicz et al., 2017.). Por lo cual se realizó un estudio en 2016 que demostró que en pacientes con esquizofrenia la tasa de prevalencia de IgG fue de un 74.8% (Awatef, 2016).

Los datos disponibles sugieren que *T.gondii* puede provocar o empeorar los síntomas de enfermedades neurodegenerativas y trastornos psiquiátricos mediante la modulación de la secreción o los efectos de algunos neurotransmisores, predominantemente dopamina. Ya que el genoma del parásito incluye 2 genes de hidroxilasa de ácido aromático, que pueden influye en la biosíntesis de dopamina y / o serotonina (Fuglewicz et al., 2017).

En seis estudios con un total de 2888 sujetos, de los cuales 1280 tenían epilepsia 477 dieron positivos para toxoplasma. La epilepsia es un desorden crónico neurológico que afecta a 70 millones de personas en el

mundo, lo que representa un gran porcentaje de la población, de mismo modo *T. gondii* afecta a un tercio de la población (Ngoungou et al., 2015).

El cerebro es uno de los principales objetivos para la formación de quistes de *T.gondii* y una variedad de células cerebrales, principalmente neuronas, pero también pueden infectarse microglia y astrocitos. Se han reportado quistes en el hipocampo y la amígdala lo que lo relaciona con la epilepsia. También provoca cambios en los niveles y las rutas de los neurotransmisores como en GABA, glutamato y serotonina, porque lo que la toxoplasmosis se puede considerar un factor de riesgo para la epilepsia (Ngoungou et al., 2015).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Tipo de estudio**

El estudio es de tipo transversal y analítico debido a que solo determina la prevalencia, asociando la presencia de anticuerpos anti-toxoplasma con factores de riesgo.

### **Área de estudio y población**

Se realizó un muestreo a 100 mujeres gestantes del municipio de Puebla con la finalidad de detectar la presencia de anticuerpos anti-toxoplasma, en el Centro de Salud Urbano No.1 de Analco en el área de Jefatura de Enfermería, en el Centro de Salud Zaragoza Insurgentes y en el CERESO de San Miguel.

### **Criterio de inclusión**

- Mujeres gestantes primigestas o múltiparas, en cualquier trimestre de gestación y que hayan acudido en ayunas.
- Todos los sujetos deben ser mayores de 18 años
- Todos los sujetos deben llevar viviendo en Puebla al menos 2 años
- Todos los sujetos deben completar, firmar y fechar la forma del consentimiento informado aprobado, previo al enrolamiento del estudio.

## **MÉTODOS Y TÉCNICAS**

### **Entrevista:**

Mediante una entrevista se les informó a las gestantes los objetivos y la utilidad de la presente investigación para que así accedieran a participar en esta, procediendo a la firma del consentimiento informado que se realizó siguiendo los lineamientos éticos del Reglamento de la Ley General de la Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Se aplicó una encuesta para obtener información acerca de los factores de riesgo que inciden directamente en la aparición de la toxoplasmosis, así como también, conocer algunas variables sociodemográficas que en un momento dado pueden contribuir indirectamente en la aparición de esta parasitosis.

#### **Obtención de muestra (suero):**

La muestra se obtuvo de sangre venosa del antebrazo con un vacutainer, vertida en un Tubo BD Vacutainer® SSTTM para Suero con Gel Separador, estas muestras se conservaron a 4°C, para su posterior transportación a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Una vez coaguladas las muestras se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos, para separar el plasma del suero. El suero (fracción superior de aspecto claro, color amarillento) se colectó con la ayuda de una pipeta Pasteur o micropipeta, se envasaron en tubos eppendorf de 1.5 ml y se guardaron a -20°C.

#### ***Elisa para determinación de IgG:***

Se realiza una disolución de 20 µL de los sueros muestreados y de los controles con 200 µL de solución diluyente de muestra (A). Posteriormente se realiza una distribución de 200 µL solución diluyente en los pocillos de la placa y una transferencia de 20 µL de la solución A en los pocillos de la placa, se cubren la placa y se incuba por 60±2 minutos a 37±1 °C.

Transcurrido el tiempo se realizaron 4 lavados con PBS Tween 20 a los pocillos, después se colocan 100 µL de solución de conjugado de anticuerpos de conejo anti IgG humana específicos conjugados a

peroxidasa (SIGMA, dilución del conjugado 1 en 1000) en todos los pocillos y se incubó por  $60 \pm 2$  minutos a  $37 \pm 1$  °C.

Se realizan otra vez los cuatro lavados, para colocar 100  $\mu$ L de sustrato (cromógeno, orto pheniledene diamine, OPD) y se incubaron por  $15 \pm 2$  min a temperatura ambiente se añaden 100  $\mu$ L de solución STOP, (ácido sulfúrico 2 Normal) para realizar la medición a 490 nm.

- Solución diluyente de muestras: Buffer Tris-ClH 0.15 N, (pH 7.2-7.4) con Tween 20, 0.5 mL por L.
- Solución diluyente de conjugado: Buffer Tris-ClH 0.15N (pH 7.2-7.4) con Tween 20, y 0.02% de albúmina de suero bovino (SIGMA).
- Solución de lavados: PBS Tween 20. 8g de ClNa, 0.2g de fosfato monobásico de potasio, 1.28 de fosfato dibásico de sodio, 0.2 g de cloruro de potasio disuelto en 1 L de agua (pH 7.2-7.4) más 0.5 ml de Tween 20 por L.

### ***Elisa para determinación de IgM:***

Se realiza una disolución de 20  $\mu$ L de los sueros muestreados y de los controles con 100  $\mu$ L de solución diluyente de muestra y 100  $\mu$ L de Absorbente RF, (A), esta se deja incubar  $15 \pm 1$  minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realiza una distribución de 200  $\mu$ L solución diluyente en los pocillos de la placa y una transferencia de 20  $\mu$ L de la solución A en los pocillos de la placa, se cubre la placa y se incuba por  $60 \pm 2$  minutos a  $37 \pm 1$  °C.

Transcurrido el tiempo se realizaron cuatro lavados con PBS Tween 20 a los pocillos, después se colocan 100  $\mu$ L de solución de conjugado de anticuerpos de conejo anti IgM humana específicos conjugados a peroxidasa (SIGMA, dilución del conjugado 1 en 1000) en todos los pocillos y se incubó por  $60 \pm 2$  minutos a  $37 \pm 1$  °C.

Se realizan otra vez los cuatro lavados, para colocar 100  $\mu$ L de sustrato (cromógeno, orto pheniledene diamine, OPD) y se incubaron por  $15 \pm 2$  min a temperatura ambiente, se añaden 100  $\mu$ L de solución STOP, (ácido sulfúrico 2 Normal) para realizar la medición a 490 nm.

- Solución diluyente de muestras: Buffer Tris-HCl 0.15 N, (pH 7.2-7.4) con Tween 20, 0.5 mL por L.

- Solución diluyente Absorbente RF (liofilizado): anticuerpos ovinos contra el fragmento Fc de las IgG humanas en disolución salina con tapón fosfato.
- Solución diluyente de conjugado: Buffer Tris-HCl 0.15N (pH 7.2-7.4) con Tween 20, y 0.02% de albúmina de suero bovino(SIGMA)
- Solución de lavados: PBS Tween 20. 8 g de ClNa, 0.2g de fosfato monobásico de potasio, 1. 28 de fosfato dibásico de sodio, 0.2 g de cloruro de potasio disuelto en 1 L de agua (pH 7.2-7.4) más 0.5 ml de Tween 20 por L.

**Prueba de avidéz:** Solo se realiza a las muestras que dieron positivo para IgG de manera pareada, se sigue la misma metodología que en la prueba Elisa de IgG con excepción de los lavados, ya que los lavados después de la colocación de las muestras se realizan para unas muestras, 3 lavados con Urea 6M en PBS-Tween y para su par, con solución de PBS Tween con intervalos de 5 min.

Cálculo del valor de avidéz:

$$\% \text{ de avidéz} = \frac{\text{Absorbancia de urea}}{\text{Absorbancia de Pbs}}$$

Este índice se multiplica por 100 y se tiene: valores mayores a 30 %: alta avidéz, valores entre 20 y 30 %: mediana avidéz, valores menores a 20 %: baja avidéz (toxoplasmosis aguda) (Besteiro, 2008).

Las muestras fueron leídas en un Lector de ELISA a 490 nm, para obtener la Absorbancia, en cada placa se contaba con un blanco, una muestra negativa y una positiva que contenía el kit para así poder estandarizar los datos.

## RESULTADOS

El cuadro 1 muestra los valores de Absorbancia de los controles negativos, los cuales sirvieron para comparar y determinar los casos positivos, ya que estos deben dar un valor mayor al control negativo.

Cuadro 1. Valores de Absorbancia de controles negativos.

Determinación	Absorbancia obtenida en control negativo
IgG	0.248
IgM	0.260

### Prevalencia de la infección

De las 100 mujeres gestantes 12 mujeres dieron positivo para anticuerpos de clase IgG y 44 para anticuerpos de clase IgM contra antígenos de *T. gondii*. Por lo que la prevalencia es de 40% (Figura 2).

Las pruebas de avidéz que se realizaron a los 12 positivos de IgG, dieron valores mayores al 30%, esto quiere decir que muestran avidéz alta por lo que es una infección mayor a 4 meses.

De los 44 casos que dieron positivos para IgM solo 32 representan una infección reciente.



Figura 2. Prevalencia de toxoplasmosis en mujeres gestantes.



### Resultados encuesta

Tras analizar los resultados de la encuesta, se obtuvo que hay un desconocimiento de un 65% de las 100 mujeres gestantes sobre la toxoplasmosis y sus causas.

En las gráficas siguientes, originadas de la encuesta, se muestra una comparativa entre mujeres embarazadas que dieron positivo y negativo a la presencia de *T.gondii*, asociadas a presencia de mascotas como factores de riesgo (Figuras 3 y 4).

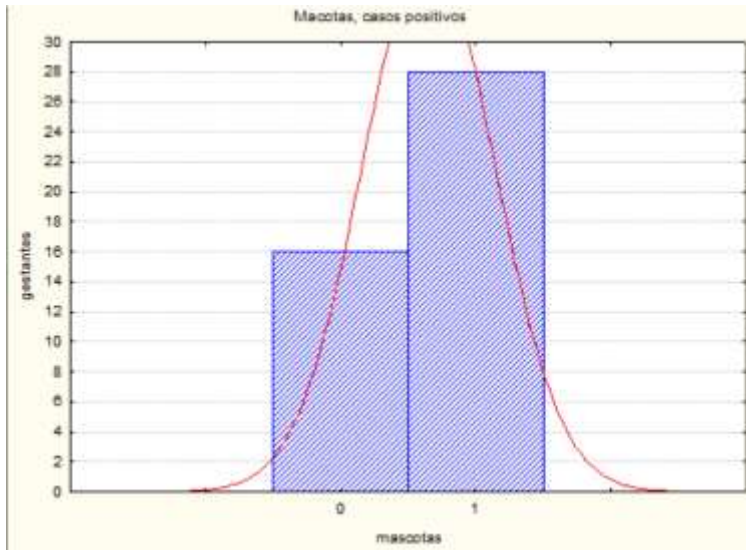


Figura 3. Gestantes que dieron positivo a *T.gondii* y cuentan con alguna mascota (gatos, perros, aves) en su hogar.

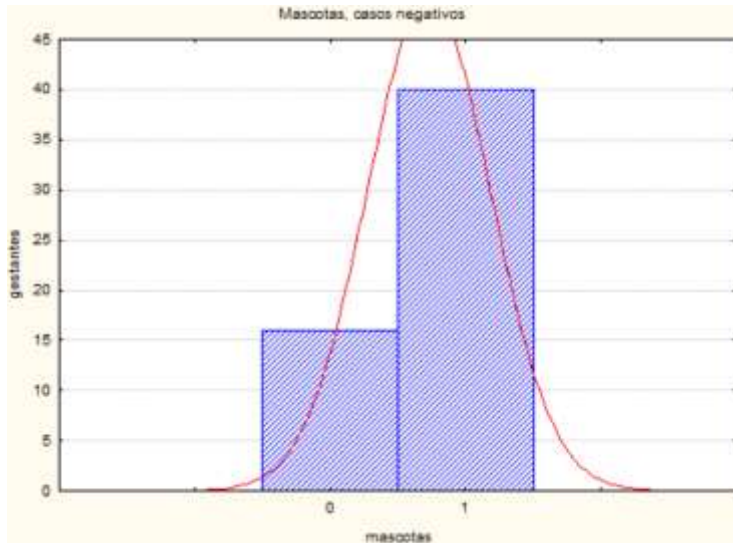


Figura 4. Gestantes que dieron negativo a *T.gondii* y cuentan con alguna mascota (gatos, perros, aves) en su hogar.

El ciclo biológico de este apicomplejo justifica ampliamente la interrogante del porque la primo infección es típica en mujeres en edad reproductiva que tienen mascotas. En la actualidad se puede observar con mayor frecuencia la tenencia de muchas especies de reptiles, aves y mamíferos e incluso anfibios como mascotas, siendo los juveniles de estas, considerados de alto riesgo para contraer Toxoplasmosis. Es común encontrar mujeres en edad reproductiva durmiendo y manipulando de manera promiscua a: Gatitos, cachorros, pollitos etc que pueden ser portadores de la infección. La figura 3 nos muestra coincidencia exacta con otros estudios practicados en mujeres en edad reproductiva y con preferencia de manipular mascotas en sus cortas edades, generalmente propensas a padecer índices elevados de parasitismo.

Los estudios muestran una prevalencia alta de anticuerpos anti-*T.gondii* en mujeres embarazadas en la ciudad de Puebla, comparada con resultados obtenidos en otros estudios de diferentes lugares.

En Latinoamérica se encuentran prevalencias para IgG del 37.5% en Guayanas utilizando IFI, en la ciudad de la Habana, Cuba se encontró una

prevalencia de 60.3%, en Chile el 40 a 75% de la población es seropositiva, en Brasil se encontró una prevalencia de 56% y, en Bolivia de 30 a 70%; lo que nos indica que la toxoplasmosis es una infección con una elevada prevalencia en nuestro continente, en el cual las mujeres que no estén protegidas están en un riesgo grande de adquirir la infección, lo cual va de la mano con las costumbres higiénicas , alimenticias, con el saneamiento ambiental y con la convivencia con reservorios y huéspedes definitivos (Jacome, 2007).

En los estudios practicados en Puebla existe un porcentaje menor, pues desde el punto de vista climatológico, los países costeros son los que muestran las mayores incidencias. En el estudio Nacional de salud de 1983, se encontró un 47% en la población general en Colombia. Así, la más alta fue encontrada en la región de la Costa Atlántica con un 63%, mientras que en la región Central fue de 36% (Jacome, 2007). Valores que se corresponden con el hallazgo en la ciudad de Puebla Nunca antes notificado; con un valor predictivo importante y que permitiera trazar estrategias de prevención de esta infección parasitaria en la población joven y en edad reproductiva del estado.

En nuestro estudio se hizo evidente un desconocimiento de la infección por parte de la población que asiste a los centros de salud, así mismo se puede observar una falta de atención hacia esta zoonosis por parte del sector salud, gratuito y público.

La transmisión de toxoplasmosis durante el embarazo es de un 40 %, y el 90% de las madres presentan de forma asintomática la infección. En casos sintomáticos las madres pueden experimentar síntomas parecidos a los de la gripe como fiebre, malestar y linfadenopatía cervical. También las madres que lo hayan contraído antes el embarazo no le transmiten el parásito al feto (Kaye, 2011).

Sin embargo, hacer el diagnóstico serológico permitiría prevenir la toxoplasmosis congénita, debido a que un alto porcentaje de las mujeres cuya primoinfección ocurre durante el embarazo y no son diagnosticadas, ni medicadas, transmitirán la infección al feto, quienes pueden desarrollar lesiones oculares y del sistema nervioso central (Reátegui y Vela, 2011).

Generalmente la infección pasa inadvertida en individuos inmunocompetentes, en los que permanece de manera crónica y no tiene

manifestaciones graves. Sin embargo, su diagnóstico es de particular importancia en individuos inmunosuprimidos, en los que se puede dar una reactivación de la enfermedad; y en mujeres que contraen la infección durante el embarazo porque la pueden transmitir al feto. El desarrollo de un sistema de ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos IgG e IgM anti-*T.gondii* y el cálculo del índice de avidéz, ayudan a determinar si la infección ocurrió recientemente (Simón, 2014). Es posible detectar en zonas rurales del estado donde existen prácticas culturales de promiscuidad con gatos y otros mamíferos y donde el consumo de carne es habitual.

A pesar de la existencia de marcadores de infección aguda como IgM o IgA, la persistencia de ellos hasta por dos años, hace que la interpretación y evaluación del riesgo de transmisión durante el embarazo sea incierta. Una alternativa es medir la avidéz funcional del antígeno y el anticuerpo, lo que permite estimar el tiempo de adquisición de la infección. Estudios anteriores en otras partes del mundo demuestran que la técnica de avidéz de IgG antitoxoplásmica permite diferenciar una infección aguda o primaria de una crónica. La prueba de avidéz ELISA para IgG anti-*T.gondii* puede ser una valiosa ayuda para distinguir mejor entre infección por *T.gondii* reciente (menos de 4 meses) y una crónica. La confirmación de un diagnóstico de infección reciente es crucial para la clínica en la toma de decisión terapéutica precoz, especialmente en embarazadas como primoinfección o infecciones congénitas asintomáticas (Torres y Gómez. 2008).

La seroprevalencia de la toxoplasmosis global está continuamente evolucionando, sujeta a parámetros socioeconómicos regionales y al comportamiento de la población. El conocimiento de estas tendencias de la seroprevalencia, particularmente en el caso de mujeres en edad fértil, permite dar fuerza a las políticas de salud públicas apropiadas, particularmente en las gestantes seronegativas en áreas de alta seroprevalencia (Reátegui y Vela, 2011).

El tamizaje maternal de toxoplasmosis permite la implementación de medidas profilácticas y terapéuticas, reduciendo la tasa de transmisión y los problemas causados al feto (Simón, 2014). Los primeros en establecer estos programas fueron Francia y Austria en 1975 y de allí se fue adoptando en otras partes del mundo. Según la normativa del

Ministerio de Salud Pública se debe determinar la presencia de IgG anti-*T. gondii* en suero a todas las mujeres embarazadas en la primera consulta. En caso de ser negativa se repite la prueba en el segundo y tercer trimestre del embarazo (Simón-Soria, 2014).

Así mismo los factores de riesgo muestran una generalidad tanto en los casos positivos como negativos por lo que se podría hacer una conjetura para determinar su efecto en la adquisición de la infección por *T. gondii*.

La toxoplasmosis se puede considerar una enfermedad transmitida por los alimentos, con la excepción de la infección congénita. Se debe conocer el ciclo biológico del parásito para estudiar los factores de exposición a *T. gondii*, es decir, con respecto a los posibles medios de ingestión de ooquistes presentes en el medio ambiente o de quistes tisulares en áreas contaminadas (Boaventura, 2018).

La infección se adquiere principalmente por la ingestión de comida y de agua contaminadas por los oocystos eliminados por los gatos o la ingestión de carne cruda que contenga los quistes. Este parásito protozoario tiene 3 formas de vida: una considerada la forma de resistencia interior o quiste; la otra llamada forma de resistencia en el medio exterior u ooquiste; y los taquizoíto o trofozoítos que están relacionados con la forma proliferativa, en la fase aguda de la enfermedad. La forma infectante es el ooquiste presente en la materia fecal de gatos y otros félidos (Sánchez et al., 2012).

Sin embargo, estudios recientes demostraron que la prevalencia de *T. gondii* en animales productores de carne disminuyó considerablemente en los últimos 20 años en áreas con manejo intensivo de granjas. Por ejemplo, en varios países de la Unión Europea, las prevalencias de *T. gondii* en cerdos de engorda son ahora del 1%. Teniendo en cuenta estos datos, es poco probable que el cerdo siga siendo una fuente importante de infección para los seres humanos en estos países. Sin embargo, es probable que las principales rutas de transmisión sean diferentes en las poblaciones humanas con diferencias en la cultura y los hábitos alimenticios. En América, los brotes recientes de toxoplasmosis aguda en humanos se han asociado con la contaminación del medio ambiente por oocistos (Tenter et al., 2000).

Por eso el conocimiento sobre el perfil sociodemográfico de la población de mujeres en edad fértil es muy importante para la formulación de acciones de atención primaria y secundaria para tratar la toxoplasmosis. Los principales factores de riesgo para esta infección descritos en la literatura incluyen: edad, nivel educativo y hábitos alimenticios (Boaventura, 2018).

## REFERENCIAS

- Alava Cantos, F. E. & Flores Gilces, F. F. (2011). Toxoplasmosis diagnosticada por el método de ELISA en mujeres embarazadas que asisten al hospital de El Empalme en el periodo comprendido de enero a junio del 2011. Tesis de Licenciatura. Universidad Técnica de Babahoyo, Los Ríos, Ecuador. Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela de Tecnología Médica.
- Alvarado-Socarras, J., Meneses-Silvera, K., Zarate-Vergara, A., Guerrero-Gomez, C., & Rodríguez-Morales, A. (2017). No todo es zika: toxoplasmosis congénita, ¿aún prevalente en Colombia? *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34(2), 332-336. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=36352106026>.
- Awatef, E., Sihem, T., Achraf, J., Fatma, T., Anouar, M., Ferid, Z., Lotfi, G., Georg, J., Hamouda, B., & Besma Bel Hadj, J. (2016). *Toxoplasma gondii* infection in schizophrenia and associated clinical features. *Psychiatry Research*, 245, 327-332. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165178116308757?via%3Dihub>.
- Berdión, Camaño E. (2015). *Un parásito intracelular: Toxoplasma gondii*. (Trabajo de fin de grado). Recuperado de <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ESTELA%20DEL%20MAR%20BERDION%20CAMAÑO.pdf>.
- Besteiro, S. (2008). Diagnóstico de toxoplasmosis aguda. Test de avidéz. *ANUARIO FUNDACIÓN Dr. J. R. VILLAVICENCI*, 16, 169-170. Recuperado de <http://www.villavicencio.org.ar/pdf08/169.pdf>.
- Boaventura -Avelar J., Gontijo-da Silva M., Alves-Rezende H. H., Ribeiro-Storchilo H., Naves-do Amaral W., Isolina-Rodrigues X., Martins-Avelino M., & Castro A.M. (2018). Epidemiological factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in postpartum women treated in

- the public healthcare system of Goiânia, State of Goiás, Brazil. *Revista de la Sociedad Brasileña de Medicina Tropical*, 51(1), 57-62. doi: 10.1590/0037-8682-0112-2017.
- Brusca, Richard C. (2005). *Invertebrados*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Canales-R, M., Navia-G, F., Torres-H, M., Concha-C, M., Guzmán-D, Ana-M., Pérez-C, C., & García-C,P. (2010). Evaluación de un test comercial de avidéz de IgG: Aporte al diagnóstico de primoinfección por *Toxoplasma gondii*. *Revista chilena de infectología*, 27(6), 499-504.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2005). *Infección por toxoplasma*. Material Safety Data Sheets – Canadian Laboratory. Recuperado de <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/toxoplasmosis-es.pdf>
- Correa, D. (2017). Toxoplasmosis. *Revista Ciencia*, 68 (1), 54-57. Recuperado de [https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68\\_1/PDF/T oxoplasmosis.pdf](https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68_1/PDF/T oxoplasmosis.pdf)
- Cortés, L. J., & Mancera L. (2009). Concordancia entre ELISA e IFI para la determinación de anticuerpos tipo IgG contra *Toxoplasma gondii*. *Revista INFECTIO*, 3(2), 76-82. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v13n2/v13n2a02.pdf>
- Dabanch P, J. (2003). Zoonosis. *Revista chilena de infectología*, 20(Supl. 1), 47-51. Recuperado de <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182003020100008>
- Fabiani,S., Pinto, B., Bonuccelli,U., & Bruschi,F. (2015). Neurobiological studies on the relationship between toxoplasmosis and neuropsychiatric diseases. *Journal of the Neurological Sciences*, 351(1-2), 3-8
- Fuglewicz-Aleksander J., Piotrowski P., & Stodolak A. (2017). Relationship between toxoplasmosis and schizophrenia: A review. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 26(6). 1031–1036
- Flisser Steinbruch Ana & Pérez Tamayo Ruy. (2006). *Aprendizajes de la parasitología basados en problemas*. México: Editores de Textos Mexicanos.

- Guzmán-Vázquez E. (2004). Las pruebas de Elisa. *Gaceta médica de México*, 140 (3), 48-49. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2004/gms043o.pdf>
- Giraldo, M. (2008). Toxoplasmosis. *Medicina & Laboratorio*, 14(7-8), 359-375. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2008/myl087-8c.pdf>
- Gisbert-Algaba I., Verhaegen B., Jennes M., Rahman M., Coucke W., Cox E., Pierre D., Katelijne D., & Stéphane De Craeye. (2018). Pork as a source of transmission of *Toxoplasma gondii* to humans: a parasite burden study in pig tissues after infection with different strains of *Toxoplasma gondii* as a function of time and different parasite stages. *INTERNATIONAL JOURNAL FOR PARASITOLOGY*, 48(7), 555–560.
- Ianiro, J. L., & Moscardi, F. (1998). Prevalencia de anticuerpos anti-toxoplasma *Gondii* en embarazadas concurrentes al Hospital Privado de Comunidad de Mar del Plata. *Revista del Hospital Privado de Comunidad*, 1(1), 5-10
- Instituto Nacional de Seguridad, Salud y Bienestar en el Trabajo. (2016). *Toxoplasma gondii*. Fichas de agentes biológicos. Recuperado de <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Parasitos/Toxoplasma%20gondii.pdf>
- Jácome, T. J. (2007). Prevalencia de infección por *Toxoplasma Gondii* en mujeres embarazadas, en Valledupar, Cesar año 2007. Tesis de Maestría. Universidad del Magdalena en convenio con la Universidad Nacional de Colombia, Santamarta.
- Kaye, A. (2011). Toxoplasmosis: diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. *Journal of Pediatric Health Care*, 25(6), 355-364. doi:10.1016/j.pedhc.2010.04.008
- Ngoungou EB., Bhalla D., Nzoghe A., Dardé M.L., & Preux P.M. (2015). Toxoplasmosis and Epilepsy-Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS Neglected Tropical Disease* 9(2), 1-10. doi:10.1371/journal.pntd.000352
- Quintana-Guzmán E. Ma., Schosinsky-Neveermann K., Davidovich-Rose H., Taylor-Castillo L., & Arias-Echandi M. L. (2000). Inmunoglobulina G Anti *Helicobacter Pylori* por Elisa y Western-blot en pacientes del



- Servicio de Gastroenterología del Hospital San Vicente de Paúl, Heredia. *Acta Médica Costarricense*, 42(1), 19-24. Recuperado de [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-60022000000100007&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022000000100007&lng=en&tlng=es).
- Reátegui B. C., & Vela, G. L. (2011). Factores socioeconómicos-epidemiológicos y su relación con la seroprevalencia de toxoplasmosis en gestantes atendidas en los hospitales “Felipe Arriola” y “Cesar Garayar”, Iquitos, Perú, 2009. *Neotropical Helminthology*, 5(1), 31-40.
- Reyes-Novelo, E., Ruíz-Piña, H., Escobedo-Ortegón, J., Rodríguez-Vivas, I., Bolio-González, M., Polanco-Rodríguez, Á., & Manrique-Saide, P. (2011). Situación actual y perspectivas para el estudio de las enfermedades zoonóticas emergentes, reemergentes y olvidadas en la península de Yucatán, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(1), 35-54.
- Sánchez-Lombana R., Couret-Cabrera M. P., Ginorio-Gavito D., Nodarse-Rodríguez A., Sánchez-Ramírez N., Soler-Guibert I., Ortúzar-Chirino A., Sanabria-Arias A. M., & Peña-Abreu R. A. (2012). Toxoplasmosis y embarazo. *Revista Cubana de Ginecología y Obstetricia*, 38(1), 99-106.
- Simón-Soria, M. X. (2014). *Desarrollo de Kits de ELISA para la detección de Toxoplasmosis en humanos*. (Tesis de maestría). Recuperado de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/5142>
- Tentera-Astrid M., Heckertha-Anja R., & Weissb-Louis M. (2000). Toxoplasma gondii: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30(12-13), 1217-1258.
- Torres-Morales E., & Gómez-Marín J. E. (2008). Evaluación de una prueba Elisa IgG de avidéz para Toxoplasma para el diagnóstico en el embarazo y la correlación con IgM e IgA en el laboratorio del centro de investigaciones biomédica de la universidad del Quindío. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 59(3), 199-205.

## Capítulo 6

### **Análisis cromosómico de *Peromyscus difficilis amplius* de San Pedro Atlixco, Tianguismanalco, Puebla**

*Jessica Usiel García Vivar<sup>1</sup>, Rosa María González-Monroy<sup>1, 2\*</sup>, Jesús  
Martínez-Vázquez<sup>1, 2</sup> y Lucero Montserrat Cuautle García<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

<sup>2</sup>Cuerpo Académico de Biología de Grupos de Organismos.

\*Autor de correspondencia: rosa.gonzalez@correo.buap.mx

#### **RESUMEN**

La citogenética, es la rama de la biología que se encarga del estudio de la estructura cariotípica, eventos citológicos y análisis cariotípico, que examina el número y morfología necesaria para observar las variaciones cromosómicas entre especies, así como su posible relación con la especiación. Un proceso crucial en este análisis es la mitosis, especialmente la metafase, ya que es la fase en la que los cromosomas se caracterizan por mantener su morfología básica, por otro lado, el cariotipo es el conjunto de cromosomas ordenados que definen a cada especie, el cual se obtiene de células en división rotas por medios mecánicos, por ello es importante obtener un cariotipo en metafase, ya que éste va a permitir observar con mayor detalle la genética de las especies. En lo que refiere a mamíferos, en poblaciones silvestres se ha demostrado que los individuos son, en cierta forma heterocigotos. En algunos casos, los genes, aun siendo parecidos, pueden estar ordenados de manera distinta debido a las alteraciones en los segmentos cromosómicos, además, estos cambios también han desempeñado un papel preponderante en el mecanismo de la formación de especies, es por ello que el objetivo de este estudio fue describir el cariotipo y las bandas

cromosómicas G y C de *Peromyscus difficilis amplus* de San Pedro Tianguismanalco, Puebla. Se capturaron organismos utilizando trampas Sherman, se les realizó la técnica de extracción de médula ósea para la obtención del cariotipo convencional y se usó Tripsina para el bandeado cromosómico G y para las bandas C se empleó Hidróxido de Bario. Los resultados indican que el cariotipo de *Peromyscus difficilis amplus* presenta  $2n=48$  y  $NF=52$  que corresponden a un par metacéntrico, dos subtelocéntricos y 20 pares telocéntricos. El cromosoma sexual X fue submetacéntrico y el sexual Y fue telocéntrico. El patrón de bandas cromosómicas G en los autosomas birrámeos presentan cinco bandas y los monorrámeos presentan de dos a tres bandas de eucromatina. Las bandas cromosómicas C indican que la heterocromatina constitutiva se encontró en la región centromérica en los autosomas. En el cromosoma sexual X se encuentra la heterocromatina constitutiva en el centrómero y en el cromosoma Y fue heterocromático. Comparando los resultados obtenidos con otras especies se puede afirmar que *Peromyscus difficilis amplus* presenta características cariotípicas primitivas conformado en su mayoría por cromosomas telocéntricos además de que los resultados obtenidos son distintos a los estudios anteriores que se han realizado para esta especie.

**Palabras clave:** cromosomas, eucromatina, heterocromatina, birrámeo, monorrámeo.

## INTRODUCCIÓN

La citogenética, es una rama de la biología que se encarga del estudio de la estructura cariotípica, las estructuras celulares y los eventos citológicos que intervienen en la formación hereditaria. Un proceso crucial en el análisis citogenético es la mitosis y dentro de ella, la metafase que es la etapa celular en la que aparecen los cromosomas (estructuras formadas con ADN y proteínas que constituyen la cromatina) en la cual los genes están arreglados de modo lineal en estructuras nucleares que resultan de la condensación de la cromatina. Los cromosomas tienen un brazo largo y un brazo corto separados por un estrechamiento o constricción primaria denominada centrómero. El brazo corto se denomina p y el brazo largo como q, mientras que el centrómero es el punto de unión del huso mitótico y es parte integral de los cromosomas

siendo parte esencial para el movimiento y segregación normal del cromosoma durante la división celular. También se define en un sentido amplio a la citogenética como aquella disciplina que trata sobre la estructura y el comportamiento de los cromosomas, así como de las implicaciones genéticas derivadas de su estudio (Herrera, 2007). La citogenética ha facilitado el entendimiento de la organización y estructura de los genomas, de ahí la importancia, basados en el ordenamiento secuencial de grandes fragmentos cromosómicos y los mapas genéticos (derivados de los análisis genéticos o de ligamiento; Herrera, 2007). Por su propia naturaleza (unidades hereditarias discretas de mutación responsables de la transmisión del genoma nuclear), los cromosomas dan testimonio directo de la historia evolutiva de los linajes existentes.

En lo que refiere a mamíferos, la citogenética ha sido utilizada para el estudio, en poblaciones silvestres ha demostrado que los individuos son, en cierta forma heterocigotos (Luque y Herráez, 2001). En algunos casos, los genes, aun siendo parecidos, pueden estar ordenados de manera distinta debido a las alteraciones en los segmentos cromosómicos. Estos cambios han desempeñado también un papel preponderante en el mecanismo de la formación de especies (Gardner, 1990).

El análisis cariotípico examina el número y la morfología de los cromosomas, el número de brazos cromosómicos, la extensión y localización de segmento heterocromáticos, el organizador nucleolar, así como las constricciones secundarias donde la citotaxonomía evalúa las semejanzas y diferencias cromosómicas entre especies y su posible relación con la especiación (Cortés, 1984). El cariotipo es la construcción cromosómica de un individuo, un rasgo característico de cada especie (Luque y Herráez, 2001), de manera que todos los organismos de una especie tienen el mismo cariotipo; sin embargo, especies similares pueden tener cariotipos muy diferentes. En el análisis cromosómico se usan como constantes cromosómicas el tamaño del cromosoma, la posición del centrómero, distribución de los cromosomas, entre otros.

También las diferentes técnicas de bandeo cromosómico han significado un considerable progreso tanto en citogenética humana como en citogenética general. Al obtenerse imágenes reproducibles de las estructuras cromosómicas transversales (bandas) de diferente tamaño a lo largo de los cromosomas, fue posible disponer de una herramienta de

identificación de cada cromosoma humano, así como de un importante número de otros organismos tanto animales como vegetales (Drets, 2002).

El valor de los diversos patrones de bandeo se da por la caracterización de cada cromosoma de diversas especies de entidades biológicas superiores, excepto los vertebrados inferiores que no las poseen (Drets, 2002). En los vertebrados y en las plantas superiores las bandas se originaron a través de prolongadísimos procesos evolucionarios acaecidos a distintos niveles evolutivos constituyendo los componentes cromosómicos observables actualmente (Drets, 2002).

Este tipo de estudios han sido una herramienta importante en el análisis genético y sistemático de los mamíferos, que han permitido comprender su evolución y taxonomía, además de tener gran relevancia en el estudio entre las relaciones filogenéticas de los taxa (Beck y Kennedy, 1977).

Los roedores son el orden más numeroso de los mamíferos ya que comprenden 33 familias 481 géneros y 2,277 especies (Wilson y Reeder, 2005). Este orden en México está representado por ocho familias y 243 especies (Ceballos, 2014). La familia Cricetidae posee una amplia distribución, ya que sólo se encuentra ausente en algunas islas. Se compone de 130 géneros y 681 especies de ratas y ratones (Musser y Carleton, 2005). En México la familia está representada por 23 géneros y 142 especies, siendo *Peromyscus* el género con mayor número de especies en nuestro país y uno de los más diversos en todo el mundo. Los cricétidos constituyen un grupo que ha sufrido el mayor número de extinciones en México (Ceballos, 2014).

El género *Peromyscus* constituye el grupo más diverso y con la distribución más amplia entre los mamíferos pequeños de Norteamérica (Chirhart *et al.*, 2005) y Centroamérica (Reid, 1997). *Peromyscus* se distribuye desde la costa del Atlántico a la costa del Pacífico y desde Canadá hasta Panamá. En México, el género tiene una amplia distribución y comprende 13 grupos: *californicus*, *eremicus*, *hooperi*, *crinitus*, *maniculatus*, *leucopus*, *aztecus*, *boylii*, *truei*, *melanophrys*, *fervus*, *megalops* y *mexicanus* (Nowak, 1999). En México el género *Peromyscus* está conformado por 51 especies (Ceballos, 2014), por lo cual se trata de un grupo diverso, complejo y heterogéneo. Este grupo es de amplia

distribución geográfica tanto en latitud como en altitud; latitudinalmente, la distribución varía desde especies que se les conoce sólo en la localidad típica, hasta aquellas que ocupan gran parte del territorio del país, mientras que altitudinalmente, se les encuentra prácticamente desde el nivel del mar hasta cerca de los 4000 m (Ramírez-Pulido *et al.*, 2001).

*Peromyscus difficilis* es un roedor de tamaño mediano con orejas grandes y una cola larga, uniformemente bicolor que es ligeramente más larga que la longitud total de la cabeza y el cuerpo. La coloración dorsal varía de pardusca a negruzca, con pelos oscuros dispuestos en líneas finas. La coloración de los flancos es la misma que la de la espalda, excepto por la presencia de una línea lateral bien definida, y sus partes inferiores son de color blanco al negro, impregnadas de plata y las orejas son grandes, pero son más cortas que la pata trasera (Ceballos, 2014; Hall, 1981).

*Peromyscus difficilis* tiene un anillo orbital negruzco, rostro largo con una fosa nasal de alrededor de 11 mm, bulas auditivas grandes y borde supraorbitario sin ángulos agudos. Los rangos de mediciones externas registradas son: longitud total de 180 a 260 mm, longitud de la cola 91 a 145 mm, longitud de la pata trasera 22 a 28 mm y longitud de la oreja 17 a 28 mm (Ceballos, 2014; Hall, 1981).

Este roedor se extiende desde el norte de Colorado hacia el sur en Oaxaca, y comprende ocho subespecies, pero solo seis se distribuyen en México: *P. penicillatus*, *petricola*, *difficilis*, *amplus*, *felipensis* y *saxicola* (Carleton, 1989; Hall, 1981; Hoffmeister y De la Torre, 1961).

*Peromyscus difficilis amplus* es endémico de México (Figura 1) y se encuentra en toda la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental y montañas adyacentes desde el suroeste de Chihuahua y el sureste de Coahuila, al sur a través de Durango y Zacatecas continuando al sur hacia partes de San Luis Potosí y regiones montañosas de Guanajuato, Puebla, Hidalgo, Tlaxcala, Veracruz y por último hacia el centro-norte de Oaxaca (Ceballos, 2014; Hall, 1981; Hoffmeister y De la Torre, 1961). *P. d. amplus* se distribuye en las montañas del sur de Hidalgo, la parte norte del estado de México, Tlaxcala, Puebla, el centro-norte de Oaxaca y el centro-oeste de Veracruz y la subespecie *P. d. difficillis* se presenta en el oeste de Chihuahua, hacia el sur a lo largo de la Sierra Madre Occidental hacia Guanajuato. *P. d. petricola* se encuentra en la Sierra Madre Oriental, en el sureste de Coahuila, al suroeste de Tamaulipas y probablemente en el

norte de San Luis Potosí y en el sur de Nuevo León (Hoffmeister y De la Torre, 1961). La distribución de *P. d. felipensis* parece estar fragmentado; esta especie se encuentra en altas elevaciones (2,500 a 3,500 m) en las montañas que rodean el Valle de México y también se encuentra en elevaciones similares en las montañas al noreste de la ciudad de Oaxaca (Cerro San Felipe y cordilleras adyacentes). Finalmente, *P. d. saxicola* se restringe a Querétaro y al norte de Hidalgo (Ceballos, 2014; Goodwin, 1954; Hall, 1981; Hoffmeister y de la Torre, 1961; Villa-Ramírez, 1953).

Dentro del grupo de roedores del género *Peromyscus* se han realizado análisis citogenéticos. Todas las poblaciones de *Peromyscus difficilis* examinados presentan un número diploide ( $2n=48$ ), como lo presentan todas las otras especies del género *Peromyscus* (Comité de estandarización de cromosomas 1977; Greenbaum *et al.*, 1978). Sin embargo, el número fundamental (NF) varía dentro de *P. difficilis* utilizando la morfología cromosómica como referencia.

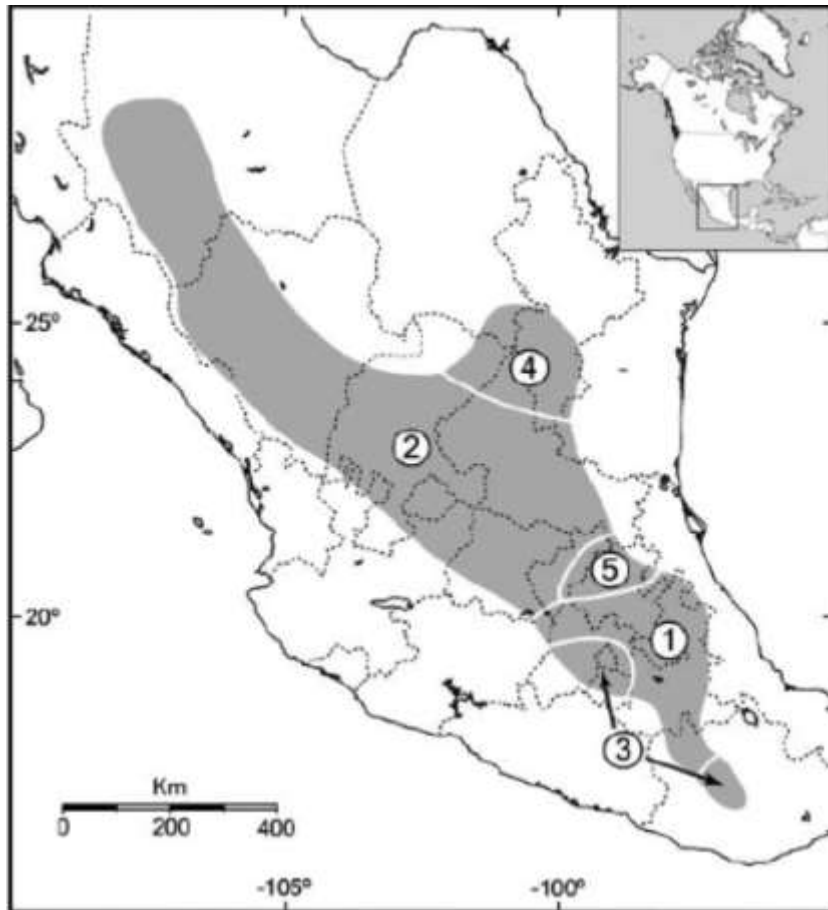


Figura 1. Distribución de las subespecies de *Peromyscus difficilis* en México,

1. *Peromyscus difficilis amplus*, 2. *P. difficilis difficilis*, 3. *P. difficilis felipensis*,
4. *P. difficilis petricola* y 5. *P. difficilis saxicola* (Hall, 1981).

Alonso (2009) realizó la descripción del cariotipo de *Peromyscus difficilis* del municipio de Ixtacamaxtlán, Puebla. Presenta un  $2n=48$  y  $NF=50$ , la morfología cromosómica corresponde a un par



submetacéntrico, un par subteloecéntrico y 21 telocéntricos, el cromosoma sexual X fue submetacéntrico y el Y fue telocéntrico.

Rodríguez (2005) examinó el cariotipo de *Peromyscus difficilis amplus* de la localidad de Camotepec, en el municipio de Zacatlán, Puebla presenta un  $2n=48$  y  $NF=66$ , corresponde a dos pares metacéntricos, ocho submetacéntricos y 13 telocéntricos, el cromosoma sexual X fue subteloecéntrico grande y el cromosoma Y fue telocéntrico pequeño. La heterocromatina se presenta sólo en el centrómero

Quiros (2003) analizó el cariotipo de *Peromyscus difficilis felipensis* del estado de Oaxaca encontrando un  $2n=48$  y un  $NF=76$ , presentando dos pares metacéntricos, 13 subteloecéntricos y ocho telocéntricos. El cromosoma sexual X fue subteloecéntrico y el Y fue metacéntrico.

*Peromyscus difficilis amplus* de Totalco, Veracruz, presenta  $2n=48$  y  $NF=66$ , incluidos dos pares de autosomas metacéntricos, ocho pares subteloecéntricos y 13 pares telocéntricos El cromosoma sexual X en *P. d. amplus* fue subteloecéntrico y el cromosoma sexual Y fue telocéntrico (Arellano-Meneses *et al.*, 2000).

*Peromyscus difficilis difficilis* de El Salto, Durango, presenta  $2n=48$  y  $NF=58$ , con 17 pares acrocéntricos y seis pares birrameos, además la heterocromatina se localiza en regiones centroméricas (Robbins y Baker, 1981). Por otro lado, *Peromyscus difficilis petricola* en Zacatecas, presenta  $2n=48$  y  $NF=56$  (Zimmerman *et al.*, 1975).

Finalmente, *Peromyscus difficilis felipensis* de los estados de México y Morelos tienen  $2n=48$  y  $NF=76$  con un metacéntrico, un submetacéntrico, 13 autosomas subteloecéntricos y ocho telocéntricos, y otra población de la misma subespecie del sureste de Oaxaca presenta  $2n=48$  y  $NF=76$  que corresponde a dos metacéntricos, 13 subteloecéntricos y ocho telocéntricos; el cromosoma sexual X fue subteloecéntrico y el cromosoma sexual Y fue metacéntrico (Müdespacher-Ziehl *et al.*, 2005).

El objetivo del presente estudio fue describir el cariotipo y el patrón de bandas cromosómicas G y C de *Peromyscus difficilis amplus* de San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco, Puebla.

### **Área de estudio**

El municipio de Tianguismanalco se localiza en la parte centro oeste del estado de Puebla. Sus coordenadas geográficas son los paralelos 18°

57' 18" y 19 ° 03' 12" de latitud norte y los meridianos 98° 24' 42" y 98° 34' 00" de longitud occidental (Figura 2). El municipio colinda al Norte con el municipio de San Nicolás de Los Ranchos, al Noreste con el municipio de Nealtican, al Sur con el municipio de Atlixco, al Sureste con el municipio de Santa Isabel Cholula y al Oeste con el municipio de Tochimilco (INEGI, 2010).

Tiene una superficie de 133 kilómetros cuadrados que lo ubica en el lugar 111° con respecto a los demás municipios del estado. En el municipio se presenta la transición de los climas templados del valle de Puebla, a los templados de la Sierra Nevada. Se identifican dos climas: Clima templado subhúmedo con lluvias en verano, el cual es el clima predominante, se presenta en la zona correspondiente al valle de Puebla y clima semifrío subhúmedo con lluvias en verano. Se identifica en las faldas inferiores de la Sierra Nevada (INEGI, 2010). En su territorio se identifican tres grupos de suelos: Suelo dominante Arenosol (72%), Regosol (14%), Phaeozem (8%), Andosol (5%) y Fluvisol (1%; INEGI, 2010).

La mayor parte del municipio presenta zonas dedicadas a la agricultura de temporal, zonas que han crecido a costa de la vegetación original. El malpaís de Nealtican y la ribera del arroyo la Leona están cubiertos por bosques de encinos, asociados a vegetación secundaria arbustiva. Las estribaciones de la Sierra Nevada conservan bosques de encino y pino principalmente, del tipo *hartwegii*. Con respecto a la fauna, el municipio cuenta con las siguientes especies silvestres: culebras, coyotes, ardillas, mapaches, cacomixtles y conejos de campo.

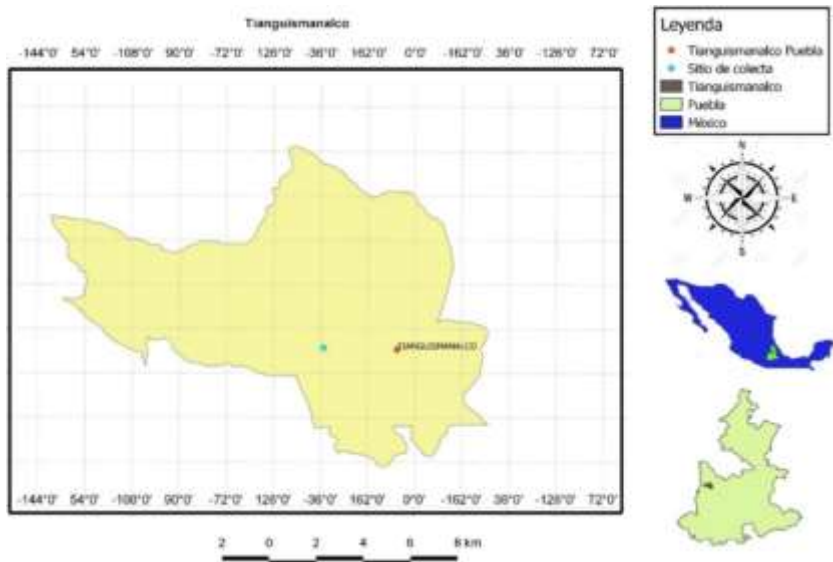


Figura 2. Sitio de colecta de *Peromyscus difficilis amplus* de San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco del Estado de Puebla.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Trabajo de campo

Se realizaron tres muestreos en 2017 en San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco del Estado de Puebla (Figura 3). Durante dos noches consecutivas en cada muestreo se utilizaron 20 trampas tipo Sherman (23 x 7.5 x 9 cm) distribuidas cada 15 pasos utilizando una marca en el sitio donde se colocó la trampa, dichas trampas fueron cebadas con hojuelas de avena y esencia de vainilla para poder capturar vivos a los individuos de *Peromyscus difficilis amplus*.

Después de haber capturado a los individuos se anotaron todos los datos y registros del lugar de colecta y del espécimen, estos datos incluyen: coordenadas geográficas de la localidad, fecha de colecta y medidas somáticas en milímetros (Longitud total, longitud de la cola

vertebral, longitud de la pata trasera derecha, longitud de la oreja derecha y peso en gramos). Posteriormente, fueron trasladados al laboratorio de Mastozoología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla para su procesamiento.



*Figura 3. Sitio de colecta San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco del Estado de Puebla (Tomada por Azusena Milán).*

### **Trabajo de laboratorio**

A los organismos capturados (tres machos y una hembra) se les realizó la técnica de extracción de médula ósea para obtener el cariotipo convencional de acuerdo con lo propuesto por Baker *et al.* (1982); Baker *et al.* (1988).

El procedimiento se realizó de la siguiente manera: los ejemplares capturados fueron pesados y caracterizados sexualmente, posteriormente se les inyectó colchicina (Microlob) al 0.004 % en una proporción de 0.1 ml por cada 10 gramos de peso, 40 minutos antes de ser sacrificados (Baker *et al.*, 1982; Baker y Qumsiyeh, 1988).

Una vez transcurrido el tiempo, los organismos fueron sacrificados por dislocación cervical, posteriormente se llevó a cabo la toma de

medidas de cada ratón, tales como: longitud total, longitud de la cola, de la pata y oreja; luego se realizó la técnica de extracción de médula ósea a cada organismo, que consiste en retirar los fémures y las tibias, eliminando el músculo de los huesos, cortando las epífisis en el extremo proximal. Con una jeringa se extrajo la médula ósea y se introdujo en tubos cónicos de 15 ml, que contenían 7 ml de solución hipotónica a 37°C, se agitaron y mezclaron con ayuda de una jeringa de 1 ml y se dejó incubar durante 40 minutos procurando agitar suavemente cada 10 minutos (Baker *et al.*, 1982; Baker y Qumsiyeh, 1988).

Enseguida el material celular se centrifugó a 800 rpm durante 8 minutos, se eliminó el sobrenadante y nuevamente se suspendió con el líquido fijador de Carnoy en la misma cantidad que el paquete celular (Metanol y ácido acético en proporción 3:1 respectivamente) este fue aplicado suavemente por las paredes del tubo.

Se realizó una taxidermia científica a los organismos con base en el método descrito por Martínez *et al.* (2006) para su identificación e incorporación a la colección de mamíferos de la Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP.

Para la elaboración de las laminillas (Baker y Qumsiyeh, 1988), primero se lavaron los portaobjetos hasta eliminar cualquier tipo de suciedad y grasa (con jabón y agua) y se colocaron en un frasco con alcohol al 96% previamente refrigerado. Posteriormente, se utilizaron pipetas Pasteur con la cual se dejaron caer tres gotas aproximadamente sobre un portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente durante varios minutos, una vez secos se etiquetaron con la fecha de elaboración, nombre de la especie, número del ejemplar y número consecutivo de cada laminilla.

Una vez secas las laminillas fueron teñidas con una solución de Giemsa al 4% (47 ml de agua, 2 ml de buffer de Fosfatos y 1 ml de Giemsa) durante 6 a 8 minutos. Posteriormente, se enjuagaron las laminillas con agua destilada con el fin de quitar el exceso de colorante y se dejaron secar a temperatura ambiente, más tarde se observaron en un microscopio óptico Marca Leica con los objetivos de 10X 40X y 100X, para buscar y ubicar los mejores campos mitóticos en metafase los cuales tuvieran un amplio esparcimiento de los cromosomas, se fotografiaron utilizando una cámara digital adaptada al microscopio óptico.

### ***Bandeo cromosómico G***

Para la elaboración de bandeo cromosómico G se utilizó la técnica De Grouchy y Turleau (1977); Paton y Baker (1978). Las preparaciones se dejaron envejecer de 5 a 7 días para después colocarlas en la estufa a una temperatura de 65°C durante 16 horas aproximadamente, con el fin de endurecer los cromosomas y producir buenos patrones de bandas. Posteriormente, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, luego se colocaron en Tripsina al 0.025% durante 80 segundos. Pasando este tiempo enseguida las laminillas se metieron en el amortiguador de Fosfato Salino (PBS) en dos vasos Coplín y se realizó un enjuague metiendo y sacando la laminilla 5 veces en cada uno de los vasos Coplín, luego se sumergió la laminilla en un buffer para realizar la tinción con el colorante Giemsa al 2% previamente agitado en un vaso Coplín durante 10 minutos. Finalmente, se sacó la laminilla y con agua destilada se quitó el exceso de tinción, se dejó secar a temperatura ambiente para que se pueda observar al microscopio óptico marca Leica utilizando los objetivos 10X 40X y 100X.

### ***Bandeo cromosómico C***

Para realizar el bandeo cromosómico C se utilizó el método descrito por Summer *et al.*, (1971) y Arrighi y Hsu (1971). Se utilizaron las mismas laminillas con los campos mitóticos se dejaron envejecer durante 7 días, pasado ese lapso se colocaron las laminillas en un vaso de precipitado que contenía HCl al 2% durante 15 minutos, se lavaron con agua destilada tres veces y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las laminillas se colocaron en un vaso Coplín conteniendo solución saturada de Hidróxido de Bario (Ba (HO)<sup>2</sup>) a 45°C por un lapso de dos minutos, posteriormente se volvieron a meter y sacar de manera simultánea en HCl tres veces, enseguida se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Después, se colocaron en cámaras húmedas (cajas Petri con papel filtro en la base, el cual se humedeció con una solución salina 2XSSC, pH 7.0). Se colocaron a lo largo de la preparación 6 gotas de 2XSSC con una pipeta Pasteur y se les colocó un cubreobjetos en la parte donde se

hallarán los campos cromosómicos, enseguida se metieron a incubar a 65°C durante 16 horas y al término de este lapso se retiró el cubreobjetos y las laminillas se enjuagaron 3 veces con agua destilada, una vez secas se mantuvieron en alcohol al 70% durante 5 minutos y al 95% también durante 5 minutos y se secaron a temperatura ambiente. Finalmente, las laminillas se tiñeron con Giemsa al 4%, la tinción estaba preparada con un amortiguador salino de Fosfato de Sodio con un pH 7.0 durante 20 minutos, se enjuagaron nuevamente con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

## RESULTADOS

Se capturaron cuatro ejemplares de *Peromyscus difficilis amplus* de San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco, Puebla. Los ejemplares obtenidos fueron tres machos y una hembra, de estos se elaboraron 42 laminillas para ambos sexos, encontrando un total de 350 campos mitóticos en metafase, se tomaron fotografías de los mejores campos.

*Peromyscus difficilis amplus* presentó un cariotipo  $2n=48$  y  $NF=52$ , el cual está conformado por un par metacéntrico, dos pares subteloicéntricos y 21 pares telocéntricos. El cromosoma X tiene una morfología submetacéntrico grande y el cromosoma Y como telocéntrico pequeño (Figuras 4 y 5).



Figura 4. Campo mitótico de ejemplar macho de *Peromyscus difficilis amplus*.

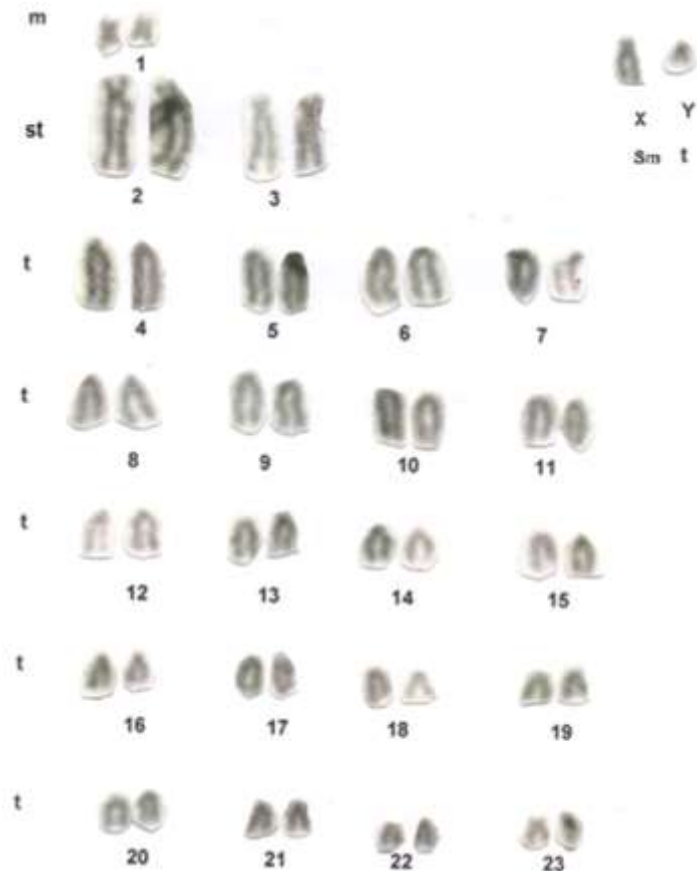


Figura 5. Cariotipo convencional de ejemplar macho de *Peromyscus difficilis amplus* de San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco del Estado de Puebla.

Los datos promedio de las longitudes relativas de los pares cromosómicos del cariotipo convencional de *Peromyscus difficilis amplus* en orden descendente de tamaño y categoría basándose en la posición del centrómero (Levan *et al.*, 1964; Cuadro 1).

Cuadro 1. Longitudes relativas de los pares cromosómicos de *Peromyscus difficilis amplus*.  $p$ =Promedio del brazo corto,  $q$ =promedio del brazo largo.  $Dsp$ =Desviación estándar del brazo corto.  $Dsq$ =Desviación estándar del brazo largo.  $Ds\ p+q$ = Desviación estándar de la longitud total del cromosoma. IC= Índice centromérico.  $m$ =Metacéntrico (Centrómero en región media).

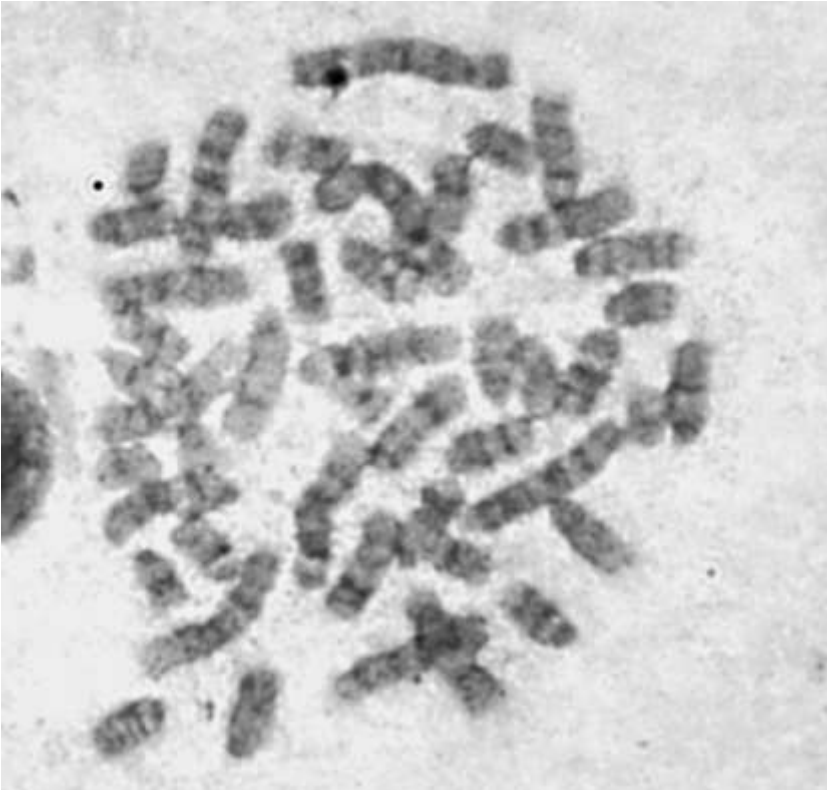


*sm*=submetacéntrico (Centrómero en región submedia). *st*=subtelocéntrico (Centrómero en posición subterminal). *t*=Telocéntrico (Centrómero en posición terminal).

Par	p	Dsp	q	Dsq	p+q	Ds p +q	IC	Clasificación de acuerdo con Levan et al. (1964)
1	1.91	2.28	2.79	0.93	4.70	1.36	40.61	m
2	2.89	0.80	11.99	2.28	14.88	2.61	19.44	st
3	3.40	1.26	11.39	1.67	14.78	1.70	22.98	st
4			13.29	1.16	13.29	1.16		t
5			11.81	1.50	11.81	1.50		t
6			10.86	1.29	10.86	1.29		t
7			10.01	1.57	10.01	1.57		t
8			9.96	1.65	9.96	1.65		t
9			9.21	2.76	9.21	2.76		t
10			8.80	1.73	8.80	1.73		t
11			7.98	1.25	7.98	1.25		t
12			7.61	0.78	7.61	0.78		t
13			7.49	1.15	7.49	1.15		t
14			7.25	1.13	7.25	1.13		t
15			6.41	3.02	6.41	3.02		t
16			6.16	1.39	6.16	1.39		t
17			5.90	0.69	5.90	0.69		t
18			5.84	1.39	5.84	1.39		t
19			5.67	1.32	5.67	1.32		t
20			4.80	0.91	4.80	0.91		t
21			4.88	1.07	4.88	1.07		t
22			4.34	1.12	4.34	1.12		t
23			4.03	0.68	4.03	0.68		t
x	4.28	1.86	11.62	2.84	15.90	2.84	26.93	sm
y			3.84	0.76	3.84	0.76		t

### ***Bandeo cromosómico G***

Se observó en el patrón de bandas cromosómicas G de *Peromyscus difficilis amplus* que la eucromatina está presente formando cinco bandas en los pares birrámeos, y los telocéntricos que sólo presentan de dos a tres bandas (Figuras 6 y 7).



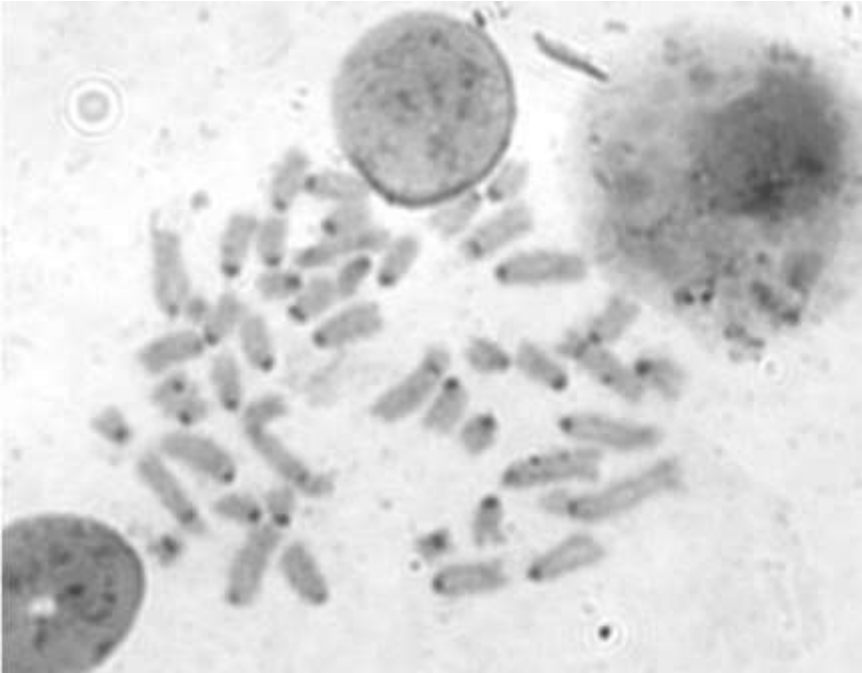
*Figura 6. Campo mitótico con bandas cromosómicas G de Peromyscus difficilis amplus.*



Figura 7. Cariotipo de bandas cromosómicas G de *Peromyscus difficilis amplus* (macho) de San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco, Puebla.

### ***Bandeo cromosómico C***

Al realizar el bandeo cromosómico C se observó que la presencia de la heterocromatina constitutiva se encuentra en la región del centrómero en los autosomas (Figuras 8 y 9).



*Figura 8. Cariotipo de bandas cromosómicas C de Peromyscus difficilis amplus de San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco, Puebla.*



Figura 9. Cariotipo de bandas cromosómicas C de *Peromyscus difficilis amplus* (macho) de San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco, Puebla.

## DISCUSIÓN

El cariotipo del ratón *Peromyscus difficilis amplus* de la localidad de San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco, Puebla, presenta un  $2n=48$  al igual que las especies que conforman al género *Peromyscus*, de tal manera que no se encontró diferencia en el número diploide y

coincidiendo con estudios realizados para este género; sin embargo, se encontró variación en el número fundamental.

El presente estudio dio como resultado un NF=52 comparándolo con estudios realizados en el estado de Puebla, Rodríguez (2005) reporta para *Peromyscus difficilis amplus* del municipio de Zacatlán un NF=66, que corresponde a 10 pares birrámeos y 13 monorrámeos, la morfología del cromosoma sexual X fue subtelocéntrico y el cromosoma Y fue telocéntrico. Otro estudio, realizado por Alonso (2009), informó sobre la misma subespecie en el municipio de Ixtacamaxtitlán, Puebla, un NF=50, dos pares birrámeos y 21 pares telocéntricos, la morfología del cromosoma sexual X fue submetacéntrico y en cromosoma Y fue telocéntrico. La variación que presenta esta subespecie puede ser por los reordenamientos cromosómicos tales como inversiones pericéntricas o translocaciones lo que les permite tener una tendencia evolutiva, reflejándose en el número fundamental dado que el género *Peromyscus* al cual pertenece la subespecie *P. d. amplus* tiene la facilidad de adaptarse a distintos ecosistemas.

Por otro lado, en la zona centro del país Müdspacher-Ziehl *et al.* (2005) reportaron para los estados de México y Morelos la subespecie *P. d. felipensis* la cual presentó para ambos estados un NF=76, que corresponden a 15 pares birrámeos, ocho pares monorrámeos y la morfología en el par sexual X fue subtelocéntrico y el Y fue telocéntrico. Al contrario de lo reportado en el estado de Oaxaca para la subespecie de *P. d. felipensis* con un NF=76, 15 pares birrámeos ocho pares monorrámeos y la morfología del par sexual X fue subtelocéntrico y en el cromosoma Y fue telocéntrico. Sin embargo, al contrastar el presente estudio con otros que se han realizado en la parte sureste del país, por ejemplo, en el estado de Veracruz por Arellano-Meneses *et al.* (2000) reportaron para la subespecie *Peromyscus difficilis amplus* un NF=66, 10 pares birrámeos y 13 pares monorrámeos, la morfología del cromosoma X fue subtelocéntrico y el Y fue telocéntrico (Cuadro 2 y 3).

Comparando la zona centro del país con la zona sur, se puede observar un incremento en el número fundamental, esto puede ser debido a que son dos subespecies. son poblaciones semi-aisladas con un alto potencial de endogamia permitiendo los reordenamientos cromosómicos (Hoffmeister y De la Torre 1961).

Por otra parte, en el norte del país Robbins y Baker (1975) realizaron un estudio cromosómico sobre la subespecie *P.d. difficilis* en el estado de Zacatecas, reportaron un NF=58, correspondientes a seis pares birrámeos y 17 pares monorrámeos. El número fundamental obtenido por Robbins y Baker (1975) fue mayor al que se obtuvo en el presente estudio, esto se puede deber a que fueron subespecies distintas y la distribución de *P. d. difficilis* es discontinua debido a la barrera geográfica por las altiplanicies en las que habita; además del aislamiento asociado a los cambios climáticos ocasionados por la glaciación del pleistoceno lo cual tuvo como consecuencia mayor restricción de flujo génico entre las poblaciones (Carleton, 1989).

La variación del NF en las subespecies de *Peromyscus difficilis* puede ser por el papel que desempeñan las barreras geográficas ya que algunas subespecies no muestran una distribución continúa lo cual marca los límites de cada una de ellas (Hoffmeister y De la Torre, 1961). Es por lo que la especie *Peromyscus difficilis* es considerada polimórfica de acuerdo con los cariotipos de sus subespecies, es importante mencionar que hasta el momento para *Peromyscus difficilis* no existe un cariotipo estándar (Hsu y Arrighi, 1968). Por otro lado, si se compara el cariotipo del presente estudio, con el cariotipo primitivo de *Peromyscus* el cual está conformado en su mayoría por la presencia de cromosomas telocéntricos demuestra que se ha tenido inversiones independientes, fusiones o translocaciones y gran variación en la presencia de heterocromatina en los brazos cortos (Greenbaum y Baker, 1978; Robbins y Baker, 1981; Yates *et al.*, 1979). También en algunos estudios se ha observado que algunos cromosomas homólogos muestran una diferencia en tamaño y forma, con pocas variaciones genéticas mostrando así diferencias cariotípicas y la distribución geográfica de los diversos grupos de *Peromyscus difficilis* que apuntan al comienzo de un conjunto de genes cambiantes.

*Cuadro 2. Comparación de las constantes cromosómicas (2n y NF) de Peromyscus difficilis amplius y P. d. felipensis.*

TAXA	2n	NF	m	sm	st	t	X	Y	AUTOR
<i>Peromyscus difficilis amplus</i>	48	66	2		8	13	st	T	Arellano-Meneses <i>et al.</i> (2000).
<i>Peromyscus difficilis amplus</i>	48	66	2	8		13	st	T	Rodríguez (2005).
<i>Peromyscus difficilis felipensis</i>	48	76	2		13	8	st	M	Quiros (2003).
<i>Peromyscus difficilis felipensis</i>	48	76	1	1	13	8	st	M	Müdspacher-Ziehl <i>et al.</i> (2005).
	48	76	2		13	8	st	M	
<i>Peromyscus difficilis</i>	48	50		1	1	21	sm	T	Alonso (2009).
<i>Peromyscus difficilis amplus</i>	48	52	1		2	20	sm	T	Presente estudio.

Cuadro 3. Comparación de la variación de pares de autosomas birrámeos y monorrámeos de *Peromyscus difficilis*.

TAXA	2n	NF	AUTOSOMAS		PAR SEXUAL		ESTADO	AUTOR
			BIRRÁMEOS	MONORRÁMEOS	X	Y		
<i>Peromyscus difficilis amplus</i>	48	66	10	13	st	t	Veracruz	Arellano-Meneses <i>et al.</i> (2000).
<i>Peromyscus difficilis amplus</i>	48	66	10	13	st	t	Puebla	Rodríguez (2005).
<i>Peromyscus difficilis felipensis</i>	48	76	15	8	st	m	Oaxaca	Müdspacher-Ziehl <i>et al.</i> (2005).
		76	15	8	st	m	México /Morelos	
<i>Peromyscus difficilis felipensis</i>	48	76	15	8	st	m		Quiros (2003).
<i>Peromyscus difficilis petricola</i>	48	56					Zacatecas	Zimmerman <i>et al.</i> (1975).
<i>Peromyscus difficilis difficilis</i>	48	58	6	17			Durango	Robbins y Baker (1975).
<i>Peromyscus difficilis</i>	48	50	2	21	s m	t	Puebla	Alonso (2009).



<i>Peromyscus difficilis amplus</i>	48	52	3	20	s m	t	Puebla	Presente estudio.
---	----	----	---	----	--------	---	--------	----------------------

En conclusión, el cariotipo de *Peromyscus difficilis amplus* fue  $2n=48$  y  $NF=52$ , conformado por un par metacéntrico, dos pares subtelocéntricos y 20 pares de autosomas telocéntricos. En caso particular para *Peromyscus difficilis amplus* tiene más cromosomas telocéntricos debido a los reordenamientos cromosómicos, tales como fusiones pericéntricas y translocaciones cromosómicas. El cromosoma sexual X fue submetacéntrico y el cromosoma Y fue telocéntrico.

En el bandeo cromosómico G se observó que la eucromatina de los cromosomas se presenta de tres a cinco bandas claras y oscuras, mientras que los telocéntricos sólo presentan de dos a tres bandas.

Para el bandeo cromosómico C se observó que la presencia de la heterocromatina se concentra en la región del centrómero de los autosomas. En el par sexual, el cromosoma X la heterocromatina se encuentra en el centrómero y el cromosoma Y es completamente heterocromático.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, C. (2009). Descripción cromosómica de *Peromyscus difficilis* de Tlajomulco del municipio de Ixtacamaxtitlán, Puebla. Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Arellano-Meneses, A. G., Hernández-Carbajal, L. A., Lira-Galera, I. E., Ruiz-Guzmán, G. y Müdspacher-Ziehl, C. (2000). Karyotypical studies on *Peromyscus difficilis amplus* (Rodentia: Muridae). *Cytologia*, 65(1), 25-28.
- Arrighi, F. F. y Hsu, T. C. (1971). Localization of heterochromatin in human chromosomes, *Cytogenetics*, 10, 81-86.
- Baker, R. J. y Qumsiyeh, M. B. (1988). Methods in chiropteran mitotic chromosomal studies. En T.H. Kunz, ed. Ecological and behavioral methods for the study of bats. Smithsonian Institution Press, Washington, D. C. 533 pp.
- Baker, R. J., Haiduk, M. W., Robbins, L. W., Cadena, A. y Koop, B. F. (1982). Chromosomal studies of South American bats and their systematic implications. En M. A. Mares y H.H. Genoways, eds.). *Mammalian*

- Biology in South America (pp. 303-327). Pymatuning Laboratory of Ecology, vol. IV. Pymatuning, Pennsylvania, 519 pp.
- Baker, R. J., Qumsiyeh, M. B. y Rautenbach, I. L. (1988). Evidence for eight tandem and five centric fusions in the evolution of the karyotype of *Aethomys namaquensis* A. Smith (Rodentia: Muridae). *Genetica*, 76(3), 161-169.
- Beck, M. L. y Kennedy, M. L. (1977). Chromosome study of *Liomys pictus*. *Journal of the Tennessee academy of science*, 52(3), 109-110.
- Bush, G. L. (1975). Modes of animal speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 6(1), 339-364.
- Carleton, M. D. (1989). Systematics and evolution. En Kirkland, G. L., Jr. and Layne, J. N. (eds.). *Advances in the study of Peromyscus (Rodentia)*. Texas Tech. University Press, Lubbock. VI+367.
- Carleton, M. D. y Musser, G. G. (1989). Systematic studies of oryzomyine rodents (Muridae, Sigmodontinae): a synopsis of *Microrozomys*. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. No. 191.
- Castro-Arellano, I. y Vázquez, E. (2016). *Peromyscus difficilis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T16658A115135855.
- Ceballos, G. y Chávez, C. (1998). Diversidad y estado de conservación de los mamíferos del estado de México. *Revista Mexicana de Mastozoología*, 3, 113-134.
- Ceballos, G. y Galindo, C. (1984). *Mamíferos silvestres de la cuenca de México*. Editorial. Limusa, México, Distrito Federal, México.
- Ceballos, G. (2014). *Mammals of Mexico*. Johns Hopkins University Press Baltimore and London.
- Chirhart, S. E., Honeycutt, R. L. y Greenbaum, I. F. (2005). Microsatellite variation and evolution in the *Peromyscus maniculatus* species group. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34(2), 408-415.
- Committee for Standardization of Chromosomes of *Peromyscus*. (1977). Standardized karyotype of deer mice, *Peromyscus* (Rodentia). *Cytogenetic Cell Genetics*, 19, 38-43.
- Cortés, F. (1984). Bando cromosómico. *Investigación y ciencia*, 97, 20-29.
- De Grouchy, J. y Turleau, C. (1977). *Clinical atlas of human chromosomes*. John Wiley y Sons, New York, U.S.A.

- Drets, M. E. (2002). Una saga citogenética: El descubrimiento de los métodos de bandeado cromosómico. Significado y proyección biomédica. *Revista Médica del Uruguay*, 18(2), 107-121.
- Gardner, J. (1990). Principios de genética. Ed. Limusa, Wiley. México.
- Greenbaum, I. F., y Baker, R. J. (1978). Determination of the primitive karyotype for *Peromyscus*. *Journal of Mammalogy*, 59(4), 820-834.
- Greenbaum, I. F., Baker, R. J. y Ramsey, P. R. (1978). Chromosomal evolution and the mode of speciation in three species of *Peromyscus*. *Evolution*, 32(3), 646-654.
- Goodwin, G. G. (1954). Mammals from Mexico collected by Marian Martin for the American Museum of Natural History. *American Museum Novitates*, 1689:1-16.
- Hall, E. R. (1981). *The mammals of North America*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, U.S.A.
- Herrera, J. C. (2007). La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 26-35.
- Hoffmeister, D. F. y De la Torre, I. (1961). Geographic variation in the mouse *Peromyscus difficilis*. *Journal of Mammalogy*, 42, 1-13.
- Hsu, T. C. y Arrighi, F. E. (1968). Chromosomes of *Peromyscus* (Rodentia, Cricetidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 7(6), 417-446.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). (2010). Compendio de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Tianguismanalco, Puebla. Clave Geostadística 21175.
- Levan, A., Fredga, K. y Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2), 201-220.
- Luque, J. y Herráez, A. (2001). Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética, conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Ed. Harcourt, Madrid, España.
- Martínez, V. J., González, M. R. y Dávila, M. J. (2006). *Manual de Métodos de recolecta de plantas y animales*. Dirección General de Fomento Editorial, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- Müdspacher-Ziehl, C., Espiritu-Mora, R., Martínez-Coronel, M. y Gaona, S. (2005). Chromosomal studies of two populations of *Peromyscus difficilis felipensis* (Rodentia: Muridae). *Cytologia*, 70(3), 243-248.

- Musser, G. G. y Carleton, M. D. (2005). Superfamily Muroidea. En D. Y. Wilson y D. M. Reeder (eds.). *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference* (pp. 501-755). Johns Hopkins University Press, Baltimore, U.S.A.
- Nowak, N. R. (1999). Walker's mammals of the world. Volume II. Johns Hopkins University Press Baltimore and London. U.S.A.
- Patton, J. C. y Baker, R. J. (1978). Chromosomal homology and evolution of phyllostomatoid bats. *Systematic Zoology*, 27, 449-462.
- Patton, J. L. y Rogers, D. S. (1993). Cytogenetics. En H. H. Genoways y J. H. Brown (eds.). *Biology of the Heteromyidae* (pp. 236-258). Special Publication. The American Society of Mammalogists. U.S.A.
- Quiros, V. R. A. (2003). Cariotipo de *Peromyscus difficilis felipensis* (Rodentia: Muridae) de una población del estado de Oaxaca. México. Reporte de Servicio Social, Departamento de Biología, UAM, Unidad Iztapalapa. Distrito Federal, México.
- Ramírez-Pulido, J., Castro-Campillo, A. y Salame-Méndez, A. (2001). Los *Peromyscus* (Rodentia: muridae) en la colección de mamíferos de la Universidad Nacional Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa (UAMI). *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, 83, 83-114.
- Reid, F. (1997). A field guide to the mammals of Central America and Southeast Mexico. Oxford University Press, U.S.A.
- Robbins, L. W. y Baker, R. J. (1981). An assessment of the nature of chromosomal rearrangements in 18 species of *Peromyscus* (Rodentia: Cricetidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 31(4), 194-202.
- Robbins, L. W., y Baker R. J. (1975). An assessment of the nature of chromosomal rearrangements in 18 species of *Peromyscus* (Rodentia: Cricetidae). *Cytogenetics and Cell Genetics*, 31, 194-202.
- Rodríguez, M. (2005). Descripción cromosómica de *Peromyscus difficilis amplus* de la localidad de Comatepec en el municipio de Zacatlán, Puebla. Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Summer, A. T., H.J. Evans y R. Buckland. (1971). New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biology*, 232, 31.32.

- Villa-Ramírez, B. (1953). Mamíferos silvestres del Valle de México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México*, 23, 269-492.
- Wilson, D. E. y D. M. Reeder. (2005). *Mammals Species of the world: A Taxonomic and Geographic Reference*. 3<sup>rd</sup> Ed, Johns Hopkins University Press, Baltimore MD, U.S.A.
- Yates, T. L., Baker, R. J. y Barnett, R. K. (1979). Phylogenetic analysis of karyological variation in three genera of *Peromyscine* rodents. *Systematic Zoology*, 28, 40-48.
- Zimmerman, E. G., Hart B. J. y Kilpatrick, C. W. (1975). Biochemical genetics of the boylii and truei species groups of the genus *Peromyscus* (Rodentia). *Comparative Biochemistry and Physiology, B. Comparative Biochemistry*, 52, 541-545.

Sitio de internet

<https://ciudadesdemimexico.com.mx/cidade.php?uf=puebla&cidade=tianguismanalco>

## Capítulo 7

### Dieta del cacomixtle (*Bassariscus astutus*) en Zapotitlán Salinas, Puebla

Raúl Neftali Herrera-Flores<sup>1</sup>, Jesús Martínez-Vázquez<sup>1, 2\*</sup> y Rosa María González-Monroy<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

<sup>2</sup>Cuerpo Académico de Biología de Grupos de Organismos.

\*Autor de correspondencia: [jesus.martinez@correo.buap.mx](mailto:jesus.martinez@correo.buap.mx)

#### RESUMEN

Los carnívoros juegan un papel importante en los ecosistemas por ser reguladores de artrópodos y vertebrados, además de ser dispersores de semillas, por lo cual el estudio de la dieta es un gran campo de interés para la conservación de los mamíferos carnívoros. El objetivo principal fue determinar la dieta del cacomixtle (*Bassariscus astutus*) en dos zonas en Zapotitlán Salinas, Puebla. El estudio se realizó en el área del Jardín Botánico, Helia Bravo Hollis. Se recolectaron muestras de material fecal del cacomixtle en dos transectos con diferente tipo de asociación vegetal, uno en matorral xerófilo y el otro en bosque de cactáceas de enero a diciembre de 2017. La dieta de *Bassariscus astutus* en Zapotitlán Salinas, Puebla, en matorral xerófilo se basó en plantas con 20%, seguido por los reptiles 19%, aves 15%, artrópodos 13%, gasterópoda 10%, mamíferos 8% y peces 1%. Mientras que, en bosque de cactáceas, *Bassariscus* consume plantas con el 28%, seguido de reptiles y aves con el 22% cada uno; artrópodos, mamíferos y gasterópodos, fueron alimentos complementarios con 11, 9 y 8% respectivamente. Con base en otros trabajos realizados en *Bassariscus astutus* las categorías de alimentos fueron similares para matorral xerófilo, considerando la materia vegetal como fuente principal de alimento, y como complementarias artrópodos, aves, mamíferos y reptiles, se registró por primera vez la presencia de

organismos de la clase Gasteropoda y peces. El análisis de los dos tipos de vegetación matorral xerófilo y bosque de cactáceas indican un total de 55 alimentos diferentes de los cuales comparten 45, siendo *Prosopis* sp el más consumido en las dos zonas en todo el año con 51.33% para matorral xerófilo y 39.11% en bosque de cactáceas, seguidos de *Solanum* sp 21.76 y 19.82%, Poaceae 18.47% y 15.99% y reptiles 17.41 y 11.13% respectivamente para cada tipo de vegetación, por lo que se concluye que *Bassariscus astutus* es un animal omnívoro generalista oportunista, debido a su gran adaptabilidad en el consumo de sus presas.

**Palabras clave:** Cactáceas, cacomixtle, dieta, heces fecales, matorral xerófilo.

## INTRODUCCIÓN

México es uno de los cuatro países con mayor número de especies animales y vegetales por lo cual se encuentra entre los países denominados “megadiversos”, que albergan entre 60 y 70 % de la diversidad conocida del planeta (Sarukhán *et al.*, 2009). En lo que se refiere a mamíferos, México está conformado por alrededor de 545 especies que han sido clasificadas en 202 géneros, 46 familias y 13 órdenes (Ceballos y Arroyo-Cabrales, 2012), de las cuales 498 son terrestres y 47 son marinas (Ramírez-Pulido *et al.*, 2008).

El orden Carnívora es uno de los mejor representados, está conformado por ocho familias, 27 géneros y 42 especies (Ceballos y Arroyo-Cabrales, 2012). Estos organismos se caracterizan por poseer una dentadura especializada para cortar y triturar, ya que presentan molares y premolares filosos y caninos muy desarrollados (Ceballos *et al.*, 2005), además de tener el oído y la vista muy desarrollados. Tales estructuras especializadas les permiten matar y devorar a sus presas, lo que los hace depredadores muy eficientes (Leopold, 2000).

Los carnívoros han llegado a un periodo de amenaza extrema, debido a la caza para la obtención de productos como pieles finas para la alta costura peletera, aunado a la destrucción de su hábitat. Asimismo, son considerados como competidores del hombre debido a sus hábitos alimentarios, lo que ha provocado la reducción de las especies en sus áreas nativas (Monroy-Vilchis, 2001).

Los carnívoros desempeñan actividades ecológicas importantes, en primera instancia se alimentan de otros mamíferos, algunos de los cuales pueden ser perjudiciales tanto para la salud como para el ecosistema, como los roedores que pueden transmitir enfermedades y dañar los cultivos. Los carnívoros se consideran controladores biológicos, además de encontrarse entre los principales grupos de dispersores de semillas (Cornejo y Jiménez, 2001), ya que consumen una gran variedad de frutos (Wilson y Reeder, 1993), los cuales mediante procesos fisiológicos producen que se retengan las semillas en el tracto digestivo por largos periodos de tiempo y estos mamíferos al recorrer áreas extensas (Herrera, 1989), promueven la germinación de las diferentes variedades de semillas que fueron consumidas (Fleming y Sosa, 1994).

La dieta de los carnívoros es uno de los aspectos más estudiados, destacando como estudios de interés el análisis de la dieta y las estrategias de la obtención de alimentos (Gittleman, 1989), ya que por medio de la dieta podemos determinar el tipo de alimentación que estos mamíferos ingieren y el grado de ocurrencia que presenta con algún tipo de organismo en específico (Guerrero *et al.*, 2002). La dieta puede determinarse por dos métodos, examinando el contenido estomacal o por los excrementos, la ventaja del último es que está disponible todo el año y puede ser colectado sin dañar o manipular a la especie de interés (Mersmann *et al.*, 1992).

Cada una de las comidas disponibles para los mamíferos carnívoros tiene un determinado valor nutritivo, se distribuye espacial y temporalmente en cierta forma, es limitada en cantidad y representa un costo energético para el animal en su captura y consumo (Gutiérrez, 1998). Debido a que un posible consumidor de dicho producto tiene un tiempo y energía limitados, este tiene que tomar decisiones de diversos tipos que pueden ayudar o afectar su supervivencia, los carnívoros adoptan diversas estrategias que permiten resolver eficientemente los problemas de forrajeo, mejorando la posibilidad de supervivencia en determinados ambientes (Gutiérrez, 1998).

La familia Procyonidae es un grupo endémico del continente americano, se distribuye desde el sur de Canadá hasta el norte de Argentina (Guzmán-Lenis, 2003). Existen seis géneros actualmente (*Bassaricyon*, *Bassariscus*, *Nasua*, *Nasuella*, *Potos* y *Procyon*) con 15



especies (Enciclovida, 2018). En México encontramos cuatro géneros con siete especies: *Bassariscus astutus*, *Bassariscus sumichrasti*, *Nasua narica*, *Potos flavus*, *Procyon insularis*, *Procyon lotor* y *Procyon pymaeus* (SEMARNAT y CONANP, 2013; Ceballos, 2014).

Las especies que se agrupan en esta familia son omnívoras con hábitos terrestres o arborícolas y se les puede encontrar solos o en grupos familiares pequeños. Son de tamaño pequeño a mediano con longitudes que van de 60 a 140 cm de largo aproximadamente y como característica distintiva tienen la cola larga, donde se alternan anillos claros y oscuros que son poco distinguibles en el género *Nasua*. La posición de las patas es de semiplantígradas a plantígradas, además poseen cinco dedos en cada pata, con las garras curvas y cortas, siendo no retráctiles a semirretráctiles. En cuanto a la dentadura varía de 40 o 36 dientes, los molares son anchos, premolares puntiagudos y pequeños, el último molar superior es relativamente más grande. En temas de reproducción, las hembras tienen camadas que varían de una a seis crías (Álvarez-Castañeda, 2000).

El cacomixtle (*Bassariscus astutus*) es de tamaño mediano, el cuerpo mide de 30 a 42 cm, con una cola de 31 a 44 cm, los animales adultos pesan entre 700 g y 1500 g (Aranda, 2012). Posee ojos grandes, rodeados por anillos negros o marrón, las orejas son redondeadas de color blanco a rosa, su cuerpo es alargado y delgado, la cola es de similar tamaño al cuerpo con el pelo esponjoso y de siete a ocho anillos negros intercalados de anillos blancos. El pelaje dorsal es grueso generalmente gris con tonos marrones y amarillo, mientras que la parte ventral es más suave y clara (Ceballos, 2014).

El cacomixtle es un animal nocturno, tímido, solitario y que no se deja ver con facilidad. Es omnívoro, por lo cual se alimenta de frutas, bayas, insectos, lagartijas, pequeños mamíferos y pájaros. Sus depredadores son los búhos, zorros, coyotes, mapaches y lince. Estos pequeños omnívoros emiten una gran variedad de sonidos que recuerdan a los del mapache (Ceballos, 2014; SEMARNAT y CONANP, 2013).

Este carnívoro se encuentra distribuido en los Estados Unidos desde el sur de Oregón y California a través de los estados del sudoeste de Texas (Hall, 1981; Pogalyen-Neuwall y Toweill, 1988). En México, su distribución va desde el desierto de la península de Baja California hasta

Oaxaca (Lawlor *et al.*, 2002). La especie generalmente se distribuye desde el nivel del mar hasta los 1400 metros (Pogalyen-Neuwall y Toweill, 1988; Toweill y Toweill, 1978; Figura 1).

Es un animal activo tanto en tierra como en los árboles, se encuentra en una variedad de hábitats como los bosques semiáridos, bosques de coníferas, chaparral, desiertos, áreas tropicales y zonas rocosas (Pogalyen-Neuwall y Toweill 1988; Toweill y Toweill, 1978). La especie se adapta bien a las áreas afectadas y se encuentran con frecuencia en zonas antropogénicas (Barja y List, 2006).



**Figura 1.** Distribución de *Bassariscus astutus* (Pogalyen-Neuwall y Toweill, 1988; Toweill y Toweill, 1978).

Es un organismo solitario y nocturno, su madriguera puede ser un hueco entre las rocas o en el tronco de un árbol. La articulación del tobillo del cacomixtle es flexible y puede girarla a más de 180 grados, una característica que lo hace un ágil trepador. Su gran cola le ayuda a

mantener el equilibrio al transitar por bordes estrechos y rocas sobresalientes, incluso permitiéndole cambiar de dirección al efectuar una voltereta. Pueden trepar a través de pasajes estrechos y amplias rajaduras o aberturas al rebotar entre las paredes (Aranda, 2012; SEMARNAT y CONANP, 2013).

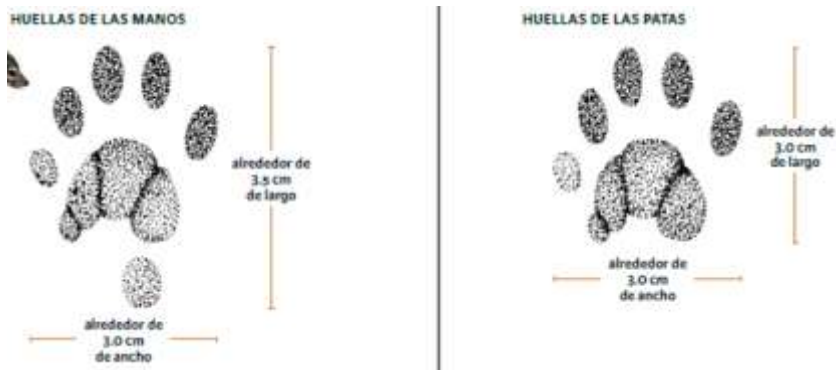
### **Características de los rastros**

El cacomixtle utiliza regularmente los senderos de la gente, por lo que es fácil encontrar sus huellas por dondequiera que la tierra este limpia y suave. Frecuentemente las huellas se encuentran encimadas, en un patrón que corresponde al trote. El cacomixtle utiliza el galope lateral y las huellas de la mano y las patas que quedan en medio pueden aparecer encimadas (Aranda, 2012; Figura 2).



*Figura 2. Disposición de las huellas en el trote del cacomixtle (Aranda, 2000).*

Las patas traseras son más grandes y robustas que las patas delanteras. Las garras son cortas y semi-retráctiles (Ceballos, 2014). Las patas delanteras tienen cinco dedos, un cojinete plantar y un pequeño cojinete subplantar del lado del dedo meñique. Ambos pares de patas son similares, pero sin el cojinete subplantar en las patas traseras y lo común es que no se marquen las garras (Aranda, 2012; Figura 3).



**Figura 3.** Medidas de las huellas de cacomixtle (Aranda, 2012).

Las excretas comúnmente se encuentran sobre piedras o troncos caídos, formando letrinas. Son de forma más o menos cilíndricas y están constituidas principalmente por restos de frutos y semillas, pelo o plumas; ocasionalmente presentan una forma trenzada, sobre todo cuando contienen mucho pelo (Aranda 2012; Figura 4).



**Figura 4.** Excreta de cacomixtle indicando sus medidas (Aranda, 2012).

En la Red List de la Unión Internacional de la Conservación de la naturaleza (IUCN, 2018) *Bassariscus astutus* se encuentra como una especie de preocupación menor (Least Concern, LC) y en la NOM-059-SEMARNAT-2010 se encuentran dos de las tres subespecies como Amenazadas (A). La especie con la que se trabajó en este estudio se encuentra en la categoría de preocupación menor (IUCN, 2018) y en la NOM-059-SEMARNAT-2010 no está catalogada.

Los estudios sobre la dieta de fauna silvestre se han llevado a cabo con la única finalidad de conocer la eficiente explotación para la

obtención de alimento, debido a que es un requerimiento vital de cualquier organismo y el modo de subsistencia por medio del aprovechamiento de los recursos que se tienen en el territorio de acuerdo con el tipo de hábitat que es ocupado por el organismo (Korschgen, 1980).

En México los estudios realizados para *Bassariscus astutus* son escasos, además de que la mayoría de estos no son actuales. La dieta de los carnívoros en Norteamérica ha sido ampliamente estudiada en comparación con los estudios realizados en Centroamérica (Cornejo y Jiménez, 2001).

El estudio realizado por Tavizon (1998) en la sierra del Carmen noroeste de Coahuila, México, en un tipo de vegetación de pino-encino y matorral desértico, concluye que *Bassariscus astutus* se alimenta principalmente de materia vegetal, seguido de *Lagomorpha* y *Peromyscus* sp que los consume con la misma frecuencia siendo de menor intensidad *Pappogeomys* sp.

Nava *et al.* (1999) determinaron los hábitos alimentarios del cacomixtle en un matorral xerófilo de Hidalgo, México, en donde los principales componentes fueron insectos (Coleoptera, Orthoptera y Formicidae), pelo y huesos de roedores (*Peromyscus difficilis* y *P. leucopus*), así como plumas y huesos de aves. Sin embargo, restos de origen vegetal se hallaron en inusual diversidad y abundancia. Durante la temporada de pre-lluvias (febrero a mayo) se observó en las excretas el máximo consumo de insectos (72%) y los restos de roedores (45%), que corresponden a especies del género *Peromyscus*, en cuanto a semillas y residuos de los frutos los más abundantes fueron *Opuntia cantabrigiensis*, seguido de *Myrtillocactus geometrizans* y fragmentos de hojas coriáceas, semillas de *Celtis pallida* y también se encontraron restos de aves (12%). En la temporada de lluvias de (junio a septiembre) se registraron en mayor número insectos (71%), *Peromyscus* (25%) y aves (11%), en cuanto a restos vegetales se registró *Myrtillocactus geometrizans* (86%) y sólo en esta época se encontraron *Aralia humilis* (14%) y *Prosopis leavigata* (11%). Durante la temporada de pos-lluvias (octubre a enero) el consumo de insectos (60%) como de *Peromyscus* disminuyó (23%) y no se encontraron restos de aves, en cuanto a semillas se incrementó la ingesta de *Opuntia cantabrigiensis* (73%).

Castellanos (2006), realizó un estudio sobre la dieta del *Bassariscus astutus* en la Reserva Ecológica del Pedregal San Ángel en la Ciudad de México, en una vegetación de matorral xerófilo. Los elementos encontrados en las excretas del cacomixtle con mayor frecuencia fueron semillas (61.54%), seguido por partes de artrópodos (34.62%), pelo y huesos de mamíferos (17.31%) y plumas (11.54%). De los elementos de origen vegetal la especie con mayor registro fue *Passiflora subpeltata* seguido de *Opuntia* sp. En cuanto a los artrópodos, se encontraron los órdenes Scorpiones, Araneae y Orthoptera. De mamíferos consumidos las especies con mayor número de registros fueron *Peromyscus gratus* y *Neotoma mexicana*. Las aves fueron las de menor frecuencia, sin haber registro de reptiles.

Romero (2008) realizó un estudio en Huehuetlán El Grande, en el estado de Puebla, donde predomina la selva baja caducifolia, describe que el cacomixtle tiene una gran preferencia por material vegetal (52.5%), teniendo a Salacayotla (73.73%), Malpighiaceae (54.76%), Ulmaceae (54.07%) y Anacardiaceae (20%), como las familias más consumidas; en segundo lugar, se registró a los artrópodos (19.03%), teniendo a los ortópteros (36.47%), odonatos (28.57%) y coleópteros (21.82%) como los más consumidos. En tanto, el consumo de mamíferos (12.5%) es bajo, pero se representa por la presencia de *Liomys irroratus* (29.5%), *Rattus norvegicus* (26%) y *Sorex vagrans* (24.6%). El consumo de aves (7%) y reptiles (12.62%), fueron alimentos complementarios.

Jiménez (2008) en el estudio realizado en Molcaxac del Progreso, Puebla, encontró que existen dos componentes alimentarios importantes para *Bassariscus astutus*, los mamíferos (74.67%), y el material vegetal (72.67%) que se observan casi en el mismo porcentaje. Del segundo componente destacan *Tucca* sp (53.33%), Malpighiaceae (49.07%), *Taxodium mucronatum* (44.44%) y *Bursera* sp (39.35%) que presentaron los porcentajes máximos en el consumo anual. *Rattus norvegicus* (44%), *Sorex vagrans* (38.61%), *Liomys irroratus* (31.48%) y *Mus musculus* (31.11%), son las principales especies presa en la alimentación anual. Dentro de los artrópodos los de mayor preferencia fueron Chalcididae (50%), Coleóptera (36.89%) y Díptera (30.56%). Los reptiles y aves fueron consumidos ocasionalmente.

Castellanos (2009) determinó la dieta del cacomixtle en San Salvador Atoyatempan, Puebla, con una vegetación de bosque tropical caducifolio, bosque de *Quercus* con matorral secundario y pastizal inducido por actividad humana, determinando que su dieta está basada principalmente en plantas con 61% de su dieta, donde las especies más importantes y consumidas fueron: *Prosopis levigata* (57%) *Karwinskia humboldtiana* (54%) lo cual lo convierte en el alimento más abundante y preferido. Los mamíferos fueron el segundo grupo más consumido durante el año (26%), donde *Peromyscus melanotis* (30%) y *Neotoma mexicana* (22.2%) fueron las principales especies en la dieta. Los insectos fueron consumidos en tercer lugar con el 13%, seguido de reptiles y aves, considerados como complementos alimenticios para el cacomixtle.

Rivera (2016) analizó la dieta del cacomixtle en el cerro Cuatlapanga, Tlaxcala en una vegetación de matorral xerófilo con bosque pino-encino. Los resultados indican que la materia vegetal (79.58%), es la mayor fuente de alimentos, seguida de artrópodos (12.96%), mamíferos (4.03%) aves (3.19%) y reptiles (0.24%). Los alimentos más consumidos durante todo el año fueron: *Juniperus* (90.51%), *Physalis* (18.25%) y *Pinus* (14.9%). Los artrópodos fueron *Phyllophaga* (8.49%), *Plusiotis* (4.39%) y Chilopoda (3.74%), para mamíferos *Oryzomys melanotis* (5.51%), *Peromyscus melanophrys* (4.36%) y *Oryzomys rostratus* (3.41%).

Hernández (2018) realizó la determinación de la dieta del cacomixtle en la zona de Valsequillo, Puebla con una vegetación de matorral xerófilo, los resultados indican que la dieta anual del cacomixtle corresponde a cuatro categorías de alimentos: el material vegetal (36.85%), aves (13.3%), artrópodos (12.4%) y mamíferos (7.15%); y en bosque de encino las plantas obtuvieron (37.2%), artrópodos (16.2%), mamíferos (8%) y aves (7.4%). En cuanto a la variación mensual se encontró que consume en todos los meses los frutos de *Juniperus* en matorral xerófilo y bosque de encino 93.9% y 93.4% respectivamente, complementando la dieta con artrópodos, mamíferos como *Mus musculus* y aves. Se concluye que en la zona de estudio y por las características de la dieta, *Bassariscus astutus* es un omnívoro generalista oportunista debido a que su alimentación es variada tanto anual como mensual, es decir, consumen lo que tiene disponible en su hábitat.

Por ende, para el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos: 1) analizar la dieta del cacomixtle (*Bassariscus astutus*) en dos tipos de vegetación (bosque de cactáceas y matorral xerófilo) en Zapotitlán Salinas, Puebla; asimismo, 2) determinar cuáles son los alimentos más importantes y analizar la variación tanto mensual como anual, así como, entre la época seca y húmeda en la composición de la dieta del cacomixtle.

### **ÁREA DE ESTUDIO**

El estudio se llevó a cabo en el municipio de Zapotitlán Salinas, en el área del Jardín Botánico Helia Bravo Hollis en el estado de Puebla (Figura 5). El municipio de Zapotitlán Salinas se localiza al sureste del estado de Puebla y se encuentra enclavado en la porción suroccidental del Valle de Tehuacán. El Valle de Zapotitlán Salinas forma parte de este municipio y comprende una superficie aproximada de 86.76 km<sup>2</sup>; se ubica en los 18° 20' de latitud norte y 97° 28' de latitud oeste. El Valle se encuentra delimitado al oriente por las sierras de Atzingo y Miahuatpec, al norte por los cerros Chacateca y Pajarito, al poniente por el cerro La Mesa y al sur por el cerro Corral de Piedra (Arias *et al.*, 2000).

El tipo de suelo que se encuentra en el Valle de Zapotitlán es comúnmente de yeso y caliza, muchas veces con altos contenidos de sales. Otros materiales presentes de importancia son suelos arcillosos, ónix y mármol (Arias *et al.*, 2000).

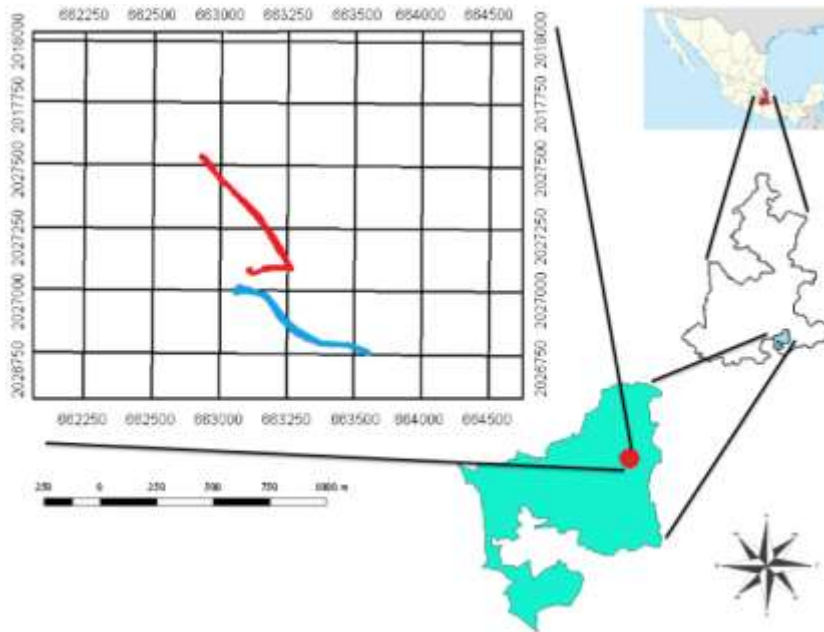
El sitio presenta un clima seco o semiárido, con una marcada época de lluvias en el verano (de mayo a septiembre). La precipitación anual es de 380 mm y su promedio de temperatura a lo largo de todo el año es de 21.2 °C. Las lluvias son escasas e irregulares y, cuando se presentan, son de tipo torrencial; además, el suelo retiene poca agua, provocando su rápido escurrimiento hacia los arroyos. Esto impide que las raíces de las plantas capten agua, además de que las lluvias torrenciales y los fuertes vientos pueden dar lugar a una intensa erosión del terreno y resequedad del medio ambiente (Arias *et al.*, 2000).

La vegetación predominante en la zona y que la caracteriza es el matorral xerófilo, bosque de cactáceas y chaparrales. Teniendo como familias representativas: Agavaceae, Arecaceae, Asteraceae, Bombacaceae, Bromeliaceae, Burseraceae, Cactaceae, Caesalpinaceae,



Crassulaceae, Eudicotyledoneas, Euphorbiaceae, Fouquieriaceae, Mimosaceae, Nolinaceae, Rhamnaceae, Simaroubaceae, Turneraceae y Verbenaceae. Muchas de estas familias tienen un gran número de especies endémicas de México (Arias *et al.*, 2000).

En cuanto a la fauna de la región podemos encontrar artrópodos de los órdenes y familias: Aracnide, Coleoptera, Hymenoptera (Formicidae), Lepidoptera, Odonata y Orthoptera. Anfibios del orden Anura. Aves de los órdenes y familias: Apodiformes, Ciconiformes (Cathartidae), Columbiformes (Cucutidae), Falconiformes (Accipitridae), Galliformes (Odontophoridae), Passeriformes (Cardinalidae, Emberizidae, Hirundinidae e Icteridae) y Strigiformes (Strigidae). Para mamíferos se encuentran el orden Chiroptera (murciélagos), las familias como: Mephitidae (zorrillos), Soricidae (musarañas), en el orden Rodentia las familias, Cricetidae, Muridae y Sciuridae, con los géneros, *Baiomys*, *Dipodomys*, *Mus*, *Peromyscus*, *Rattus*, *Reithrodontomys* y *Spermophilus*, y mamíferos medianos como: *Canis latrans* (coyote), *Dasypus novemcinctus* (armadillo), *Didelphis virginiana* (tlacuache), *Lynx rufus* (gato montés), *Odocoileus virginianus* (venado cola blanca), *Puma concolor* (puma), *Sylvilagus cunicularius* (conejo) y *Sylvilagus floridanus* (conejo). En el caso de los reptiles el orden Squamata con los subórdenes Autarchoglossa, Gekkota, Iguania, Lacertilia y Serpentes con las familias, Colubridae, Elapidae y Viperidae (*Crotalus*) y el orden de los Testudines de la familia Kinosternidae (SEMARNAT y CONANP, 2013).



**Figura 5.** Ubicación del municipio de Zapotitlán Salinas y los transectos (color rojo, zona de bosque de cactáceas y de color azul, zona de matorral xerófilo).

### Trabajo de campo

La alimentación de *Bassariscus astutus* se determinó mediante la recolección de excretas durante un año (enero a diciembre de 2017). Se eligieron dos transectos de 1.5 km sobre caminos principales y senderos dentro del jardín botánico, uno en vegetación de bosque de cactáceas y el otro en matorral xerófilo. Estos se recorrieron dos veces por mes (Figura 6). Las excretas fueron colectadas en bolsas de papel, a las que se registraron los siguientes datos: coordenadas geográficas, transecto al que pertenecía, fecha, número y medidas de la excreta (largo y ancho).



Figura 6. Transectos en los que se colectaron las muestras. A) Bosque de cactáceas y B) Matorral xerófilo.

### Trabajo de laboratorio

Las heces fecales colectadas se transportaron al laboratorio de Mastozoología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, donde se dejaron secar a temperatura ambiente (15 días), siendo separadas utilizando tamices de diferentes aberturas de malla.

Los diferentes componentes (semillas, pelos, plumas, huesos, basura, escamas e insectos) se colocaron en una bolsa de celofán y se etiquetaron con los datos: transecto al que pertenecía, fecha, número de excreta y medidas de la excreta (largo y ancho). Posteriormente, se procedió a la identificación de cada uno de los componentes. En cuanto a semillas e insectos, especialistas se encargaron de su identificación, para pelos se utilizó la técnica de escamas y de médulas descrita por Arita (1986).

Para la técnica de escamas, se colocaron de dos a tres gotas de resistol blanco en un portaobjetos y con ayuda de otro portaobjetos se deslizó para obtener una ligera capa, donde se colocaron las muestras de pelos, una vez seca la laminilla, se retiraron los pelos cuidadosamente con ayuda de unas pinzas de disección y así las escamas quedaron impresas, las laminillas se observaron al microscopio óptico con el objetivo 40X y se procedió a identificar el patrón de escamas con ayuda del catálogo de pelos de guardia dorsal de mamíferos del Estado de Oaxaca, México (Baca-Ibarra y Sánchez-Cordero, 2004).

## **Análisis de resultados**

Se registraron en una base de datos en Excel los datos obtenidos con: fecha, número de transecto, número de excreta y componentes consumidos. El análisis de los componentes encontrados en las heces fecales se utilizó para calcular la frecuencia de ocurrencia de cada alimento consumido (Aranda, 2012).

FO: Frecuencia de ocurrencia

$$FO = F/N (100)$$

En dónde:

FO: frecuencia de las excretas en las que apareció un alimento

F: número de veces en las que aparece una presa por mes

N: número total de heces en cada mes.

Para comparar si existen diferencias entre el alimento que consume *Bassariscus astutus* entre los dos tipos de vegetación (bosque de cactáceas y matorral xerófilo) y entre épocas (seca y húmeda) se realizó la prueba de “t” Student. Esta prueba sólo se realizó en los alimentos que fueron más consumidos por el cacomixtle, utilizando el programa estadístico PAST (Paleontological Statistics software) versión 3.19.

## **RESULTADOS**

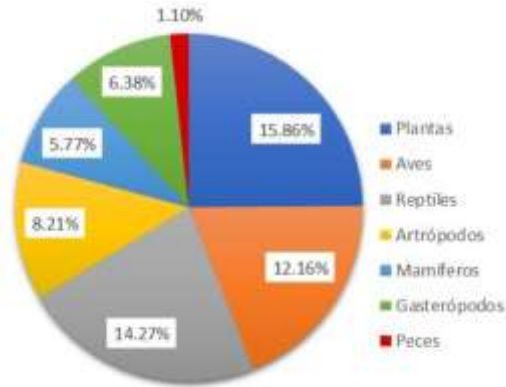
Se recolectaron un total de 636 excretas de cacomixtle (*Bassariscus astutus*) en los dos tipos de vegetación considerados en el estudio. En los meses de enero, agosto, febrero y diciembre hubo un mayor número de recolecta de heces fecales teniendo 66, 65, 57 y 57 muestras respectivamente, mientras que, en el mes de octubre se registró la menor cantidad de excretas con 36 (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Número de excretas colectadas por mes en los dos tipos de

Mes/ número de excretas	Bosque de cactáceas	Matorral xerófilo	Total
Enero	33	33	66
Febrero	31	26	57
Marzo	30	22	52
Abril	39	12	51
Mayo	35	10	45
Junio	50	6	56
Julio	43	13	56
Agosto	48	17	65
Septiembre	32	21	53
Octubre	25	11	36
Noviembre	22	20	42
Diciembre	35	22	57
<b>Total</b>	<b>423</b>	<b>213</b>	<b>636</b>

vegetación.

Con base en el análisis de las 636 excretas obtenidas durante este trabajo se determinó que *Bassariscus astutus* se alimenta principalmente de plantas, al obtener un porcentaje de ocurrencia (PO) del 15.86%, seguido de reptiles con el 14.27%, después aves con el 12.16% y en menor proporción artrópodos, gasterópodos, mamíferos y peces con 8.21%, 6.39%, 5.77% y 1.10% respectivamente (Figura 7).



**Figura 7.** La dieta de *Bassariscus astutus* se compone de siete grupos de alimentos consumidos.

Por tipo de vegetación se encontró que en bosque de cactáceas se obtuvo un total de 423 heces fecales, para junio hubo un mayor número de excretas recolectadas (50) y en noviembre una menor cantidad de excretas con 22. Con respecto a matorral xerófilo se encontró un total de 213 excretas, enero fue el mes con mayor número de colectas encontrando 33 heces fecales y junio como el mes con menos excretas recolectadas únicamente con seis.

El análisis de los excrementos, indica un total de 55 componentes diferentes para los dos tipos de vegetación. En el bosque de cactáceas se encontraron 53 alimentos, teniendo como componente principal para el cacomixtle a *Prosopis* sp al ser consumido en los 12 meses y obtener una frecuencia de ocurrencia (FO) de 39.11%, seguida de la familia Sapotaceae con 20.69%, mientras que, los alimentos menos consumidos fueron *Cryptotis parva* y *Trox* sp con 2% y sólo encontrados en el mes de junio (Cuadros 2 y 3). Para el matorral xerófilo se encontraron 47 alimentos, en donde el principal componente fue *Prosopis* sp al ser consumida durante los 12 meses y tener una frecuencia de ocurrencia de 51.33 %, seguida de *Estalor* con 23.48% y los peces fueron el alimento menos consumido con 1.10 % encontrado únicamente en marzo (Cuadros 4 y 5).

Cuadro 2. Alimentos consumidos por el cacomixtle durante un año en bosque de cactáceas

Reino	Clase	Orden	Familia	Género y especie	Frecuencia de ocurrencia (%)
Plantae	Magnoliopsida	Malpighiales	Fabaceae	<i>Prosopis</i>	39.11
	Magnoliopsida	Ericales	Sapotaceae		20.69
	Magnoliopsida	Solanales	Solanaceae	<i>Solanum</i>	19.82
	Magnoliopsida	Caryophyllales	Cactaceae	<i>Neobuxbaumia tetetzo</i>	19.14
	Liliopsida	Poales	Poaceae		15.99
	Liliopsida	Poales	Poaceae	<i>Zea mays</i>	14.25
	Magnoliopsida	Malpighiales	Euphorbiaceae	<i>Croton</i>	13.69
	Magnoliopsida	Caryophyllales	Cactaceae	<i>Opuntia</i>	10.80
	Magnoliopsida	Malpighiales	Euphorbiaceae	<i>Acalypha</i>	10.57
	Magnoliopsida	Caryophyllales	Cactaceae	<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	8.90
	Magnoliopsida	Rosales	Rhamnaceae		7.14
	Magnoliopsida	Sapindales	Burseraceae		6.56
	Magnoliopsida	Malpighiales	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia</i>	6.38
	Pinopsida	Cupressales	Cupressaceae	<i>Juniperus</i>	3.33
	Animalia	Mammalia	Rodentia	Heteromyidae	<i>Dipodomys phillipsii</i>
Mammalia		Rodentia	Sciuridae	<i>Otospermophilus mexicanus</i>	6.10
Mammalia		Lagomorpha	Leporidae	<i>Sylvilagus cunicularius</i>	5.22
Mammalia		Rodentia	Cricetidae	<i>Reithrodontomys flavesceus</i>	4.93
Mammalia		Rodentia	Cricetidae	<i>Peromyscus melanophrys</i>	4.69
Mammalia		Rodentia	Cricetidae	<i>Peromyscus difficilis</i>	4.63
Mammalia		Carnivora	Canidae	<i>Canis familiares</i>	4.54
Mammalia		Rodentia	Muridae	<i>Mus musculus</i>	4.41
Mammalia		Rodentia	Muridae	<i>Rattus norvegicus</i>	4.29
Mammalia		Rodentia	Cricetidae	<i>Peromyscus maniculatus</i>	3.70
Mammalia		Rodentia	Cricetidae	<i>Reithrodontomys</i>	3.69
Mammalia		Rodentia	Cricetidae	<i>Reithrodontomys musculus</i>	3.33
Mammalia		Rodentia	Cricetidae	<i>Reithrodontomys megalotis</i>	3.02
Mammalia		Lagomorpha	Leporidae	<i>Sylvilagus floridanus</i>	2.69
Mammalia		Soricomorpha	Soricidae	<i>Cryptotis parvus</i>	2.00
Aves					10.74
Reptilia					11.13
Gastropoda					3.97
Hexapoda		Coleoptera	Trogidae		9.78
Hexapoda		Coleoptera	Tenebrionidae		9.57
Hexapoda		Coleoptera	Melolonthidae	<i>Xylorites</i>	9.27
Arachnida		Scorpiones			9.02
Hexapoda		Coleoptera	Scarabaeidae	<i>Phyllophaga ilhucaminai</i>	8.25
Chilopoda					8.11
Hexapoda		Coleoptera	Scarabaeidae	<i>Estafor</i>	7.56
Hexapoda		Coleoptera	Melolonthidae		7.56
Hexapoda		Orthoptera	Acrididae		5.60
Hexapoda		Hymenoptera	Formicidae		5.51
Hexapoda		Coleoptera	Scarabaeidae	<i>Phyllophaga</i>	3.84
Hexapoda		Hymenoptera	Formicidae	<i>Pogonomyrmex barbatus</i>	3.13
Hexapoda		Coleoptera			3.13
Hexapoda		Coleoptera	Scarabaeidae	<i>Ligyris</i>	2.88
Hexapoda		Coleoptera	Carabidae		2.86
Hexapoda	Coleoptera	Meloidae		2.67	
Hexapoda	Coleoptera	Chrysomelidae		2.60	
Hexapoda	Coleoptera	Carabidae	<i>Tetracha</i>	2.60	
Diplopoda				2.56	
Crustacea				2.08	
Hexapoda	Coleoptera	Carabidae	<i>Trox</i>	2.00	

Cuadro 3. Alimentos presentes en la dieta mensual del cacomixtle en el bosque de cactáceas.

	Taxa/mes	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Frecuencia de ocurrencia (N)
	Número de excrementos	33	33	30	39	35	50	43	48	32	25	22	35	
Plantae	Protops	33.33	9.08	6.67	30.77	54.29	40.00	97.67	87.5	71.88	12.00	22.73	2.86	39.11
	Solanum	21.21	6.45	13.33				4.76	20.83	52.17	20.00			19.82
	Sapotaceae	3.03	33.33											26.71
	Rhamnaceae	3.03	33.33	3.33	2.56	2.86	4.00	2.33						5.71
	Croton	3.03	9.08							2.08			13.64	40
	Zea mays	15.15	9.08	10	5.13							12.00	36.36	11.43
	Euphorbia			0.67	2.56			11.63	8.33	6.25				2.86
	Burseraceae				10.26	2.86								6.56
	Mytillococcus geometrizans				2.56	17.14	16.00	4.65	4.17					8.90
	Juniperus			3.33										3.33
	Acalypha	33.33	3.23	20.00	2.56		2.00	2.33						10.57
	Neobursera hirsuta					14.29	40.00	13.95	8.33					19.14
	Opuntia							20.93	2.08	9.38				10.8
	Poaceae	18.18	6.45	26.67	17.95	14.29	14.00	9.30	10.42	25.00	16.00	13.64	20	15.99
Mammalia	Canis familiaris		3.23	10.00					2.08				2.86	4.54
	Batonyx musculus		3.23			2.86	2.00				4.00	4.55		3.33
	Batonyx	3.03				2.86		2.33		6.25	4.00			3.69
	Cryptotis parva						2.00							2.00
	Sylvilagus floridanus		3.23			2.86	2.00							2.69
	Oryzomys phyllotis mexicanus		9.08		10.26	5.71	4.00		2.08	6.25	8.00		2.86	6.10
	Reithrodontomys megalotis	3.03		3.33			2.00	2.33				4.55	2.86	3.02
	Reithrodontomys flavescens	3.03	6.45							6.25	4.00			4.93
	Dipodomys phillipsi		6.45											6.45
	Mus musculus			3.33	2.56	8.57	4.00	2.33	2.08	3.13	8.00			5.71
	Peromyscus difficilis					5.71			4.17		4.00			4.63
	Peromyscus maniculatus			6.67	2.56	2.86		4.65	2.08		4.00	4.55	2.86	3.70
	Peromyscus melanophrys			13.33	2.56		2.00	2.33			4.00	4.55	5.71	4.69
	Sylvilagus carolinensis		6.45		2.56					2.08	3.13	8.00	9.09	5.22
Rattus norvegicus		3.23					2.00			6.25	4.00	4.55	5.71	
Aves		18.18	19.35	13.33	15.38	5.71	10.00	18.6	2.08	6.25	8.00	9.09	2.86	
Reptilia			12.9	3.33	10.26	17.14	26.00	11.63	16.67	3.13		4.55	5.71	
Arthropoda	Trux							2.00						2.00
	Meloidae	3.03		6.67	2.56	8.57	20.00	2.33	12.5	6.25	8.00		5.71	7.56
	Crysomelidae								2.08	3.13				2.60
	Vitellinae	6.06		6.67	2.56	11.43	8.00	11.63	8.33	18.75	8.00	9.09	11.43	9.27
	Trogidae	3.03		3.33	122.82	8.57	6.00	13.95	14.58	3.13	12.00	27.27	2.86	9.78
	Chilopoda	3.03		6.67	7.69	2.86	8.00		8.33		8.00	22.73	5.71	8.11
	Carabidae					2.86								2.86
	Phytolopho illucaminis			3.33		11.43	10.00							8.25
	Diplopoda				2.56									2.56
	Phytolopho				2.56		6.00	2.33	2.08	6.25				3.84
	Linyphia					2.86	4.00	2.33	2.08	3.13				2.88
	Eutator				2.56		8.00	23.26	4.17				4.55	2.86
	Tembrionidae	6.06	6.45	10.00		5.71	14.00	4.65	8.33	12.5	8.00		20.00	9.57
	Acrididae						6.00	2.33	2.08		12.00			5.60
	Meloidae			3.33			2.00							2.67
	Crustacea									2.08				2.08
	Pogonomyx borborus										3.13			3.13
	Tetracho									2.08	3.13			2.60
	Formicidae					5.71	8.00			2.08	6.25			5.51
	Coleoptera										3.13			3.13
	Scorpiones	3.03		13.33	10.26	5.71	6.00	2.33	10.42	3.13	12.00	27.27	5.71	9.02
Gastropoda							2.00	4.17	6.25	4.00	4.55	2.86	3.97	



**Cuadro 4.** Alimentos consumidos por el cacomixtle durante un año en matorral xerófilo.

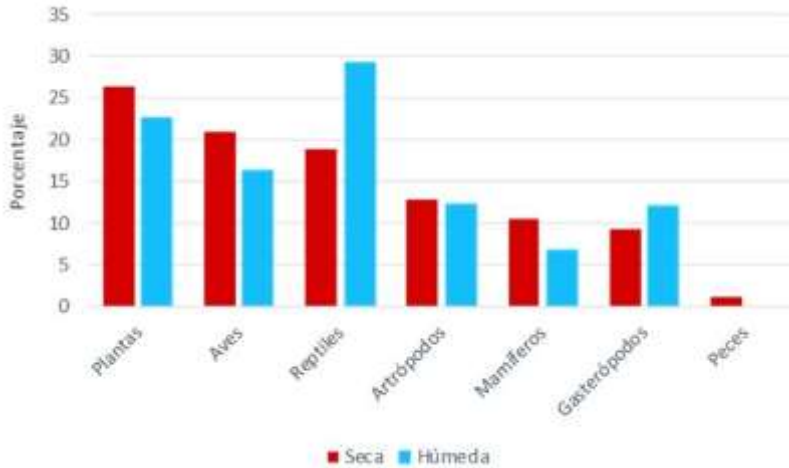
Reino	Clase	Orden	Familia	Género y especie	Frecuencia de ocurrencia (%)	
Plantae	Magnoliopsida	Malpighiales	Fabaceae	<i>Prosopis</i>	51.33	
	Magnoliopsida	Solanales	Solanaceae	<i>Solanum</i>	21.76	
	Magnoliopsida	Caryophyllales	Cactaceae	<i>Opuntia</i>	21.61	
	Pinopsida	Cupressales	Cupressaceae	<i>Juniperus</i>	21.01	
	Magnoliopsida	Malpighiales	Euphorbiaceae	<i>Croton</i>	19.95	
	Liliopsida	Poales	Poaceae		18.47	
	Magnoliopsida	Caryophyllales	Cactaceae	<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	18.12	
	Magnoliopsida	Malpighiales	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia</i>	15.94	
	Magnoliopsida	Ericales	Sapotaceae		13.40	
	Magnoliopsida	Caryophyllales	Cactaceae	<i>Neobuxbaumia tetetzo</i>	13.13	
	Magnoliopsida	Malpighiales	Euphorbiaceae	<i>Acalypha</i>	10.44	
	Magnoliopsida	Sapindales	Burseraceae		8.33	
	Liliopsida	Poales	Poaceae	<i>Zea mays</i>	8.21	
Magnoliopsida	Rosales	Rhamnaceae		6.06		
Animalia	Mammalia	Rodentia	Cricetidae	<i>Peromyscus melanophrys</i>	11.92	
	Mammalia	Rodentia	Cricetidae	<i>Peromyscus maniculatus</i>	10.43	
	Mammalia	Lagomorpha	Leporidae	<i>Sylvilagus floridanus</i>	9.31	
	Mammalia	Rodentia	Heteromyidae	<i>Dipodomys phillipsii</i>	9.09	
	Mammalia	Rodentia	Cricetidae	<i>Baiomys musculus</i>	8.33	
	Mammalia	Rodentia	Muridae	<i>Mus musculus</i>	7.79	
	Mammalia	Carnivora	Canidae	<i>Canis familiares</i>	7.69	
	Mammalia	Lagomorpha	Leporidae	<i>Sylvilagus cunicularius</i>	7.57	
	Mammalia	Rodentia	Sciuridae	<i>Otospermophilus mexicanus</i>	7.27	
	Mammalia	Rodentia	Cricetidae	<i>Reithrodontomys flavesceus</i>	7.20	
	Mammalia	Rodentia	Cricetidae	<i>Reithrodontomys megalotis</i>	6.52	
	Mammalia	Rodentia	Cricetidae	<i>Peromyscus difficilis</i>	6.06	
	Mammalia	Rodentia	Muridae	<i>Rattus norvegicus</i>	5.14	
	Mammalia	Rodentia	Cricetidae	<i>Baiomys</i>	4.55	
	Mammalia	Soricomorpha	Soricidae	<i>Cryptotis parva</i>	3.85	
	Mammalia	Cingulata	Dasypodidae	<i>Dasypus novemcinctus</i>	3.85	
		Aves			13.59	
		Reptilia			17.41	
		Peces			1.10	
		Gastropoda			8.80	
		Hexapoda	Coleoptera	Scarabaeiidae	<i>Estafor</i>	23.48
		Hexapoda	Coleoptera	Melolonthidae		19.41
		Hexapoda	Coleoptera	Scarabaeiidae	<i>Phyllophaga</i>	16.67
		Hexapoda	Coleoptera			16.67
		Hexapoda	Coleoptera	Melolonthidae	<i>Xylorites</i>	13.56
		Hexapoda	Coleoptera	Scarabaeiidae	<i>Phyllophaga illucaminal</i>	13.33
		Hexapoda	Coleoptera	Tenebrionidae		11.50
		Chilopoda				9.91
		Arachnida	Scorpiones			9.53
		Hexapoda	Orthoptera	Acrididae		8.38
	Hexapoda	Coleoptera	Chrysomelidae		5.88	
	Hexapoda	Hymenoptera	Formicidae	<i>Pogonomyrmex barbatus</i>	4.76	
	Hexapoda	Coleoptera	Trogidea		3.03	

Cuadro 5. Alimentos presentes en la dieta mensual para matorral xerófilo.

Taxa/ítem	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Frecuencia de ocurrencia (%)
Número de excrementos	33	26	22	12	10	6	13	17	21	11	20	22	
<b>Plantae</b>													
Prosopis	54.55	46.15	45.45	50.00	70.00	50.00	100	100	66.67	9.09	15.00	9.09	51.33
Solanum	18.18	15.38		8.33					29.41	61.9	10.00		21.76
Sapotaceae	9.09	3.85										27.27	13.40
Rhamnaceae	6.06												6.06
Ortizia	6.06	26.92									15.00	31.82	19.95
Zea mays	6.06	7.69								9.09	10.00		8.71
Euphorbia	15.15	15.38	33.64	41.67			15.38	11.76	9.52		5.00		15.94
Burseraceae				8.33									8.33
Myrtillacoctus premettians					30.00	16.67	7.69						18.17
Juniperus			36.36	16.67	10.00								21.01
Acalypha			18.18		10.00		7.69	5.88					10.44
Neobuddleium tetetoe					20.00	16.67	7.69	11.76	9.52				13.13
Opuntia							38.46		4.76				21.61
Poaecae	15.15	7.69	4.55	8.33	10.00		23.08	17.65	28.57	36.36	20.00	31.82	18.47
<b>Mammalia</b>													
Conis familiaris		7.69											7.69
Blatomys musculus				8.33									8.33
Blatomys			4.55										4.55
Cyrotobis parvus		3.85											3.85
Sylvilagus floridanus									4.76				4.55
Oryzomys macleani					10.00								4.55
Reithrodontomys megalotis	3.03				10.00								6.52
Reithrodontomys fluscens	6.06			8.33									7.20
Dipodomys phillipsi	9.09												9.09
Mus musculus	6.06	3.85				16.67			4.76	9.09	5.00	9.09	7.79
Peromyscus difficilis	6.06												6.06
Peromyscus maniculatus	6.06	3.85								18.18		13.64	10.43
Peromyscus melanophrys					10.00	16.67				9.09			11.92
Sylvilagus cunicularius		3.85							4.76		5.00	9.09	7.57
Aotus norvegicus								5.88			5.00	4.55	5.14
Dasylops novemcinctus		3.85											3.85
<b>Aves</b>	12.12	15.38	9.09	8.33	50.00	16.67		5.88	4.76	9.09		4.55	13.59
<b>Reptilia</b>	9.09	3.85	4.55	8.33		50.00			19.05	27.27	30.00	4.55	17.41
<b>Peces</b>			3.10										3.10
<b>Arthropoda</b>													
Meloidae	3.03	7.69				16.67	15.38	5.88	19.05	18.18			19.41
Crysomelidae								5.88					5.88
Blattella	6.06				20.00	16.67	7.69	11.76	19.05	9.09		18.18	13.56
Formicidae	3.03												3.03
Chilopoda	6.06		4.55		10.00		23.08	11.76	4.76	9.09	10.00		8.91
Phyllophaga iliacornis					10.00	16.67							13.33
Phyllophaga						16.67							16.67
Etalor	3.03						61.54	5.88					23.48
Tenebrionidae		7.69				16.67	15.38	5.88	14.29	9.09			11.90
Acridae								11.76			5.00		8.38
Popononymex barbatus									4.76				4.76
Coleoptera						16.67							16.67
Scorpiones	3.03		4.55		10.00		23.08	11.76	4.76	9.09	10.00		9.53
<b>Gastropoda</b>	3.03								14.29	9.09			8.80

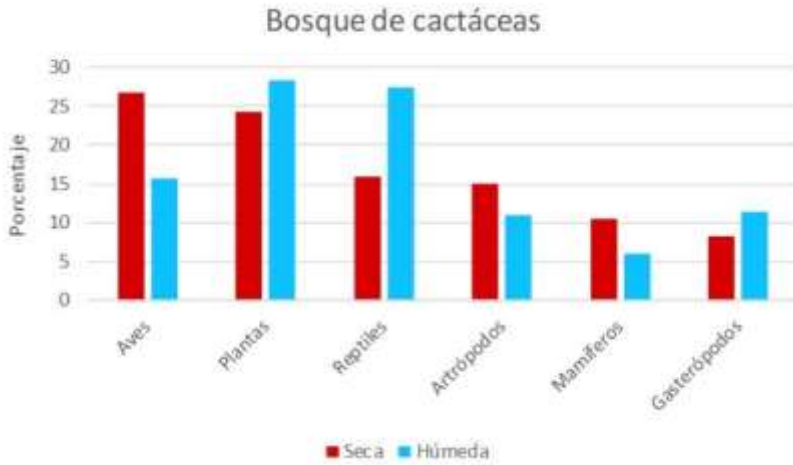
La alimentación del cacomixtle por épocas en ambos tipos de vegetación (bosque de cactáceas y matorral xerófilo) revela que, en época seca consume plantas, aves, reptiles, artrópodos, mamíferos, gasterópodos y peces con una frecuencia relativa de 26.31%, 21%, 18.91%, 12.86%, 10.5%, 9.38% y 1.05%, respectivamente; mientras que, en la época húmeda consume reptiles 29.20%, plantas 22.73%, aves 16.46%,

artrópodos 12.51%, gasterópodos 12.11% y mamíferos 6.98%, respectivamente (Figura 8).

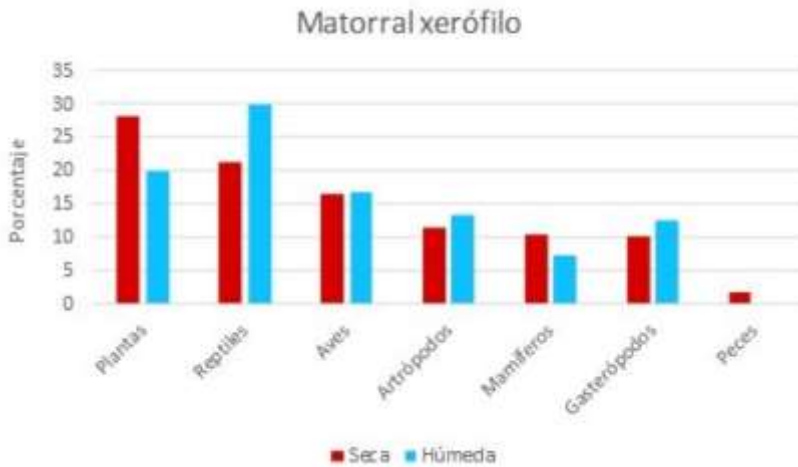


**Figura 8.** Alimentación de *Bassariscus astutus* en ambos tipos de vegetación en la época seca y húmeda.

En cuanto a tipo de vegetación en bosque de cactáceas se encontró que, en época seca los alimentos más consumidos fueron aves con 26.67%, plantas 24.18%, reptiles 15.92%, artrópodos 14.58%, mamíferos 10.42% y gasterópodos 8.23%, en época húmeda se observó que consumen plantas, reptiles aves, gasterópodos, artrópodos y mamíferos con una frecuencia relativa del 28.43%, 27.42%, 15.69%, 11.42%, 10.98% y 6.07%, respectivamente. Para matorral xerófilo en época seca consume plantas, reptiles aves, artrópodos, mamíferos, gasterópodos, y peces con 27.98%, 21.25%, 16.56%, 11.51%, 10.55%, 10.28% y 1.87%, respectivamente; mientras que en época húmeda se alimenta de reptiles 30.06%, plantas 20.04%, aves 16.86%, artrópodos 13.23%, gasterópodos 12.44% y mamíferos 7.39% (Figuras 9 y 10).



**Figura 9.** Alimentos consumidos por el cacomixtle (*Bassariscus astutus*) en bosque de cactáceas para la época seca y húmeda.



**Figura 10.** Alimentos consumidos por el cacomixtle (*Bassariscus astutus*) en matorral xerófilo para las épocas seca y húmeda.

### Análisis estadístico

Al comparar la frecuencia de ocurrencia de los principales alimentos consumidos por el cacomixtle entre los transectos mediante la prueba de t de Student, se observa que en los siguientes alimentos no existe diferencias significativas al obtener los siguientes valores; *Prosopis* sp F=1.086, p=0.3217, Poaceae F=0.292, p=0.688, aves F=0.321, p=0.6595, reptiles F=0.9414, p=0.3658 y *Xilorites* F=3.314, p=0.09348.

Comparando la frecuencia de ocurrencia entre las épocas (seca y húmeda) del bosque de cactáceas los principales alimentos consumidos por el cacomixtle mediante la prueba de t de Student, se observa que para los siguientes alimentos no existen diferencias significativas al obtener los siguientes valores; Poaceae F=0.4028 p=0.5414, aves F=1.109, p=0.3226, reptiles F=2.794, p=0.142, *Xilorites* F=4.109, p=0.07475 y *Mus musculus* F=0.352, p=0.5723, sin embargo, *Prosopis* sp fue el único que presentó diferencias significativas al registrar un valor de F=18.73, p=0.005064. Para las épocas (seca y húmeda) en el matorral xerófilo, se observa que en los siguientes alimentos no existe diferencias significativas al obtener los siguientes valores; Poaceae F=0.2574, p=0.6244, aves F=0.6151, p=0.4862, *Xilorites* F=0.8648, p=0.4118 y Chilopoda F=1.418, p=0.2984, sin embargo, *Prosopis* sp fue el único que presentó diferencias significativas al registrar un valor de F=9.699 y, p=0.01918.

### DISCUSIÓN

En el estudio realizado en el Jardín Botánico Helia Bravo Hollis se encontró que *Bassariscus astutus* en bosque de cactáceas y en matorral xerófilo, se alimenta principalmente de material vegetal (31.73%), seguido de reptiles (28.54%), aves (24.33%), artrópodos (16.42%), gasterópodos (12.77%), mamíferos (11.53%) y peces (1.10%), el consumo de material vegetal es similar a lo registrado por Castellanos (2006), en una vegetación de matorral xerófilo donde se alimenta con mayor frecuencia de frutos (61.54%), seguido de artrópodos (34.62%), mamíferos (17.31%) y aves (11.54%), sin embargo al tener ambas áreas una vegetación similar, en el presente estudio se encontraron algunos alimentos diferentes como: reptiles, gasterópodos y peces.

Nava *et al.* (1999) realizaron la comparación de dieta entre épocas, consideraron como grupo principal a los insectos tanto para época seca, como húmeda, a diferencia de lo registrado en el Jardín Botánico Helia Bravo Hollis, que para la época húmeda fueron los reptiles 49.43% y en época seca, fueron las plantas 27.65%, seguido de aves, artrópodos, mamíferos, gasterópodos, el grupo de los peces sólo aparecieron en la época seca. Los estudios antes mencionados se realizaron en matorral xerófilo, por lo que se esperaría que los resultados fueran similares, sin embargo, existen factores como el impacto en el ecosistema que el hombre ha provocado (Gómez, 1976) y la energía que los animales gastan al consumir los alimentos (Morrison *et al.*, 1992), por lo que cada organismo ha implementado estrategias para alimentarse (Susquist y Susquist 1989); de acuerdo con Gómez (1976) y Susquist y Susquist (1989) se considera al cacomixtle un mamífero oportunista, ya que consume alimentos disponibles en su ambiente.

En el presente estudio se considera que el principal alimento del cacomixtle fue la materia vegetal, al presentar una frecuencia de ocurrencia del 15.86%, seguido de reptiles, aves y como alimentos complementarios a los grupos de artrópodos, gasterópodos, mamíferos y peces; sin embargo, autores como: Estrada-Coates y Estrada (1986); Tavizon (1998); Jiménez (2008), consideran como alimentos principales tanto la materia vegetal como los vertebrados pequeños.

Al realizar la comparación de los resultados de la dieta de *Bassariscus astutus* del presente estudio en una vegetación de bosque de cactáceas y matorral xerófilo, con lo obtenido por Rivera (2016) quien trabajó en un matorral xerófilo y bosque de pino-encino, registró especies importantes como: *Juniperus*, aves y *Oryzomys melanotis*, siendo diferente a lo registrado en el presente estudio donde *Prosopis* (45.23%), es considerado el alimento más importante al estar presente en todo el año, seguido de *Solanum* (20.79%) y Poaceae (17.23%). Servín y Huxley (1991) hacen referencia a que los alimentos varían de acuerdo a la zona esto puede ser por la disponibilidad de los diferentes recursos de cada ecosistema.

En una vegetación de bosque tropical caducifolio, bosque de *Quercus* con matorral secundario y pastizal inducido por actividad humana, Castellanos (2006) concluyó que el cacomixtle tiene gran

preferencia por el material vegetal (*Prosopis levigata* y *Karwinskia humboldtiana*), seguido de mamíferos (*Peromyscus melanotis* y *Neotoma mexicana*), siendo el consumo de artrópodos, aves y reptiles alimentos complementarios, a pesar de que *Bassariscus astutus* consume los mismos grupos, las especies registradas para cada estudio son distintas ya que cada ecosistema tiene sus propias especies tanto vegetales como animales.

González (1982) considera al cacomixtle como herbívoro al tener únicamente en su registro el consumo de material foliar, semillas de piñón y frutos, por lo que difiere con el presente estudio, ya que se obtuvo en las excretas una gran cantidad de componentes de las presas como: hueso, pelos, plumas, escamas de reptil y peces, conchas, una gran variedad de semillas y artrópodos, con base en estos resultados se puede considerar a *Bassariscus astutus* como un mamífero omnívoro.

El cacomixtle a pesar de ser considerado como carnívoro, se alimenta principalmente de frutos en un 31.73%, teniendo registros de *Prosopis*, Sapotaceae, *Solanum* y Poaceae, por lo que coincide con Wilson y Reeder (1993); You-Bing *et al.* (2008), quienes aseguran que mamíferos carnívoros grandes consumen grandes cantidades y variedades de frutos. Dado a que *Bassariscus astutus* defeca una variedad de semillas, y no afecta a su germinación, según lo registrado por Fleming y Sosa (1994), en este estudio *Bassariscus astutus* es considerado como un dispersor de semillas al igual que controlador de plagas por consumir *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y Melolonthinae.

Este organismo consume tanto plantas como animales, siendo un organismo generalista y oportunista, debido a que no consume algún alimento exclusivo, ni están adaptados para comer una sola cosa, coincidiendo con Hernández (2018) y Rivera (2016) en considerar a *Bassariscus astutus* como omnívoro generalista-oportunista.

Los principales componentes de la dieta de *Bassariscus astutus* en el jardín botánico Helia Bravo Hollis, para los dos tipos de vegetación, fueron materia vegetal con 15.86%, reptiles con 14.27%, seguido de aves, artrópodos, gasterópoda, mamíferos y peces como alimentos complementarios.

Se registraron un total de 55 alimentos para los dos tipos de vegetación y no comparten los siguientes alimentos: *Ligyris*, Carabidae, Meloidea, *Tatracha* Diplopoda y *Trox* que solo se encontró en bosque de

cactáceas; en cambio para matorral xerófilo únicamente se encontró que consume peces y *Dasyopus novemcintus*.

*Prosopis* estuvo presente durante los 12 meses del año y fue el alimento más consumido en ambos tipos de vegetación con 39.11% en bosque de cactáceas y 51.33% en matorral xerófilo.

*Prosopis*, Poaceae y aves fueron los alimentos que estuvieron presentes durante los 12 meses en bosque de cactáceas y matorral xerófilo, a diferencia de peces (marzo), *Dasyopus novemcintus* (febrero) y *Pogonomymes babatus* (septiembre).

Se concluye que la alimentación de *Bassariscus astutus* es omnívora al consumir en diferentes proporciones plantas, reptiles, aves, artrópodos, gasterópoda, mamíferos y peces, por lo que podemos decir que es un organismo oportunista, dispersor de semillas y controlador de especies.

## REFERENCIAS

- Álvarez-Castañeda, S. T. (2000). *Mamíferos del noroeste de México II*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., México.
- Aranda, M. (2000). *Huellas y otros rastros de los mamíferos grandes y medianos de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Aranda, M. (2012). *Manual para el rastreo de mamíferos silvestres de México*. México. Arte Editorial.
- Arias-Toledo, A., A. Valverde-Valdés y Reyes Santiago. M. T. J. (2000). *Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla*. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Arita, W. H. T. (1986). Identificación de los pelos de guardia de los mamíferos del Valle de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Baca-Ibarra, I. I. y Sánchez-Cordero, V. (2004). Catálogo de pelos de guardia dorsal de algunos mamíferos del estado de Oaxaca, México. *Anales del Instituto de Biología*. Universidad Nacional Autónoma de México. 75(2), 387-437.
- Barja, I. y List, R. (2006). Faecal marking behaviour in ringtails (*Bassariscus astutus*) during the non-breeding period: Spatial characteristics of latrines and single faeces. *Chemoecology*. 16, 219-222.



- Castellanos A. J. A. (2009). Dieta de carnívoros del Municipio de San Salvador Atoyatempan, Puebla. Tesis de Licenciatura, Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Castellanos, M. G. (2006). Sobre el ámbito hogareño y los hábitos alimenticios de un carnívoro en un ambiente sub urbano El pedregal de San Ángel. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Ceballos, G. (2014). *Mammals of Mexico*. Johns Hopkins University Press Baltimore.
- Ceballos, G. y Arroyo-Cabrales, J. (2012). Lista actualizada de los mamíferos de México 2012. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, *Revista Mexicana de Mastozoología Nueva época*, 2,1-27.
- Ceballos, G., Arroyo-Cabrales, J., Medellín, R. A. Medrano, L. y Oliva, G. (2005). Diversidad y conservación de los mamíferos de México. En Ceballos, G. y G. Oliva (Eds.). *Los mamíferos silvestres de México* (pp. 21-66). México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Fondo de Cultura Económica.
- Cornejo, A. y Jiménez, M. P. (2001). Dieta del zorro andino *Pseudalopex culpaeus* (Canidae) en el matorral desértico del sur de Perú. *Revista de Ecología Latinoamericana*, 8(1), 1-9.
- Estrada-Coates, A. y Estrada, A. (1986). Manual de identificación de campo de los mamíferos de la estación de biología "Los Tuxtlas". Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Fleming, T. H. y Sosa, V. J. (1994). Effects of nectarivorous and frugivorous mammals on reproductive success of plants. *Journal of Mammalogy*, 75, 845-851.
- Gettleman, J. L. (1989). *Carnivore behavior, ecology and evolution*. Chapman y Hall, London.
- Gómez-Pompa, A. 1976. *Antología ecológica* (volumen 26). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- González, M. F. (1982). Estudios preliminares sobre el cacomixtle (*Bassariscus astutus*), en el Municipio de Agua Leguas Nuevo León, Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Guerrero, S., Badii, M. Zalapa, S. y Flores, A. (2002). Dieta y nicho de alimentación del coyote, zorra gris, mapache y yaguarundí en un

- bosque tropical caducifolio de la costa sur del estado de Jalisco, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 86, 119-137.
- Gutiérrez, G. (1998). Manual de análisis experimental del comportamiento. Madrid España.
- Guzmán-Lenis, A. R. (2003). Revisión preliminar de la familia Procyonidae en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 9(1), 69-123.
- Hall, E. R. (1981). *The Mammals of North America*. John Wiley and Sons, New York, USA.
- Hernández, G. C. (2018). Hábitos alimentarios del cacomixtle (*Bassariscus astutus*) en Valsequillo, Puebla. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Herrera, C. M. (1989). Frugivory and seed dispersal by carnivorous mammals, and associated fruit characteristics, in undisturbed Mediterranean habitats. *Oikos*, 55, 250-262.
- Jiménez, G. L. (2008). Dieta de carnívoros en Molcaxac del Progreso, Puebla. Tesis de Licenciatura, Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Korschgen, L. J. (1980). *Food and nutrition of cottontail rabbits*. Missouri, Missouri. Department of conservation terrestrial. Series number 5. Jefferson City, Missouri.
- Lawlor, T. E., Hafner, D. J., Stapp, P. T., Riddle, B. R. y Álvarez-Castañeda, S. T. (2002). Mammals. En T. J., Case, M. L. Cody y E. Ezcurra (eds.). *A new island biogeography of the Sea of Cortés* (pp. 271–312). New York: Oxford University Press.
- Leopold, S. A. (2000). *Fauna silvestre de México*. Editorial Pax México.
- Mersmann, T. J., Buehler, D. A., Fraser, J. D. y Seegar, J. K. D. (1992). Assessing bias in studies of bald eagles' food habits. *Journal of Management*, 56, 73-78.
- Monroy-Vilchis, O. (2001). Hábitos alimentarios y abundancia relativa del coyote (*Canis latrans*), en una comunidad indígena de Michoacán. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Morrison, M. L., Marcot, B. G. y Mannan, R. W. (1992). *Wildlife habitat relationships*. University of Wisconsin Press.

- Nava, V., Tejero, D. y Chávez, C. (1999). Hábitos alimenticios del cacomixtle (*Bassariscus astutus*), en Matorral Xerófilo de México. *Anales del Instituto de Biología*. Universidad Nacional Autónoma de México, 70(1), 51-63.
- Poglayen-Neuwall, I. y Toweill, D. E. (1988). *Bassariscus astutus*. *Mammalian Species*, 327, 1-8.
- Ramírez-Pulido, J., Arroyo-Cabrales, J. y González-Ruiz, N. (2008). Actualización del catálogo de autoridades de los mamíferos terrestres de México. Fase II. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Base de datos SNIB-CONABIO, proyecto ES010, México.
- Rivera, B. R. M. (2016). Análisis de la dieta del cacomixtle (*Bassariscus astutus*) en el Cerro Cuatlapanga, Tlaxcala. Tesis de Licenciatura, Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Romero, R. L. (2008). Determinación de la dieta del zorro gris (*Urocyon cinereoargenteus*) y el cacomixtle (*Bassariscus astutus*) de Huehuetlán El Grande Puebla. Tesis de Licenciatura, Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Sarukhán, J., Koleff, P., Carabias, J. y Soberón, J. (2009). *Capital natural de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). 2013. Programa de manejo de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán. Consultado en [https://www.conanp.gob.mx/que\\_hacemos/pdf/programas\\_manejo/tehuacan\\_2013.pdf](https://www.conanp.gob.mx/que_hacemos/pdf/programas_manejo/tehuacan_2013.pdf)
- Servín, J. C. y Huxley, C. (1991). La dieta del coyote en un bosque de encino-pino de la Sierra Madre Occidental de Durango, México. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, 65, 89-99.
- Susquist, M. E. y Susquist, F. C. (1989). Ecological constraints on predation by large felids. En J. L. Gittleman (ed.). *Carnivore behaviour, ecology and evolution* (pp. 238-301). New York: Cornell University Press.
- Tavizon, J. P. (1998). Estudio del nicho alimenticio de los mamíferos depredadores de la orden carnívora en la sierra del Carmen noroeste

- de Coahuila. México. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Toweill, D. E. y Toweill, D. B. (1978). Growth and development of captive ringtails (*Bassariscus astutus flavus*). *Carnivore*, 1, 46-53.
- Wilson, D. E. y Reeder, D. M. (eds).(1993). *Mammals species of the World: a Taxonomic and geographic reference*. Washington D. C.: Smithsonian Institute Press.
- You-Bing, Z., Liang, Z., Yayoi, K., Chris, N. y Xiao-Ming, W. (2008). Frugivory and seed dispersal by a small carnivore, the Chinese ferret-badger, *Melagoleoschata*, in a fragmented subtropical forest of central China. *Forest Ecology and Management*, 225, 1595-1603.
- Sitios de internet
- [http://www.iucnredlist.org/details/41680/0-Bassariscus astutus](http://www.iucnredlist.org/details/41680/0-Bassariscus_astutus) (24/01/2018)
- [http://iztapopo.conanp.gob.mx/documentos/fichas\\_de\\_especies/Bassariscus \\_astutus.pdf](http://iztapopo.conanp.gob.mx/documentos/fichas_de_especies/Bassariscus_astutus.pdf) (26/01/2018)
- <http://www.enciclovida.mx/especies/8003059> (01/02/2018)
- [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/56302/Anexo\\_III\\_NOM\\_059.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/56302/Anexo_III_NOM_059.pdf) (01/02/2018)
- <https://www.gbif.org/species/2433557> (30/09/1018).

## Capítulo 8

### Empleo de reguladores de crecimiento en el cultivo *in vitro* de *Ampelocissus acapulcensis*

Missael Molina Gorgonio<sup>1</sup>, Verónica Cepeda-Cornejo<sup>1\*</sup> y Dalia Molina-Romero<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Molecular y de Cultivos, Edif. EMA 6, Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, México

<sup>2</sup>Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología, Edif. 1BIO1, Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, México

\*Autor de correspondencia: [veronica.cepeda@correo.buap.mx](mailto:veronica.cepeda@correo.buap.mx)

#### RESUMEN

*Ampelocissus acapulcensis* pertenece a la familia Vitaceae y en México es considerada como una uva silvestre con un gran potencial agroindustrial. Los estudios sobre la germinación o propagación sexual o asexual de esta especie son escasos. El objetivo de este trabajo es establecer las condiciones experimentales para la propagación *in vitro* de explantes con el uso de diferentes reguladores de crecimiento (RC) vegetal de manera individual o combinada. En este trabajo se buscó establecer un protocolo para la propagación de manera *in vitro* de esta especie a través de la organogénesis indirecta a partir de explantes de hoja de plantas jóvenes de *A. acapulcensis*. La combinación de reguladores del crecimiento más efectiva para la inducción de callos a partir de explantes de hoja de *A. acapulcensis* con respecto a los tratamientos control sin fitohormonas, resultó ser 6-bencilaminopurina (BAP) en combinación 1mg de ácido naftalenacético (ANA), BAP en combinación con ácido 2,4-

diclorofenoxiacético (2,4-D), y kinetina (KIN) en combinación con 2,4-D; siempre que las BAP y KIN mantengan una concentración de 0.5, 1 y 1.5 mg/l. Los resultados son de interés en la industria biotecnológica para el desarrollo y crecimiento de células, explantes y organismos de *A. acapulcensis* con utilidad en la industria vitivinícola y farmacéutica.

Palabras clave

*Ampelocissus acapulcensis*, vid silvestre, cultivo *in vitro*, reguladores de crecimiento, diferenciación vegetal

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos vegetales o propagación *in vitro*, es una técnica que consiste en cultivar bajo condiciones estériles y artificiales, cualquier tejido vegetal desde tallos, peciolos, hojas, yemas, raíces y semillas (Castillo, 2004), empleando un medio favorable para su diferenciación, desarrollo y crecimiento. Al finalizar el proceso, se obtiene una nueva planta. El contenido de nutrientes en el medio de cultivo y los reguladores de crecimiento (RC) o fitohormonas son igualmente relevantes para obtener resultados favorables (Bathia y Bera, 2015). El cultivo de tejidos vegetales se basa en la totipotencialidad o capacidad para dar origen a cualquier tipo celular. Las células totipotenciales son las únicas que pueden regenerar no solo tejidos y órganos, sino que también cuentan con la capacidad de regenerarse por completo (Yildiz, 2012). Resumiendo, las técnicas del cultivo *in vitro* permiten el crecimiento y diferenciación de las células con un control de los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos de las plantas.

La regeneración de las plantas se puede lograr por organogénesis y embriogénesis somática. Existen dos vías de organogénesis de una planta la indirecta y la directa. La primera ocurre con la formación de órganos directamente a través del callo, a esto se le conoce como organogénesis indirecta. La segunda es la vía directa que consiste en la formación de brotes compuestos de yemas, tallos, peciolos y hojas, a partir de un tejido. Es importante resaltar que, en la organogénesis directa, el tejido no atraviesa por la etapa intermedia de formación de callo. Por otra parte, la embriogénesis somática es el resultado de la formación de embriones a partir de células esporofíticas (cultivadas), lo que significa que en este

proceso los embriones surgen indirectamente y tienen la capacidad para desarrollar una planta completa (Bathia y Bera, 2015).

Uno de los aspectos importantes del cultivo *in vitro* es la esterilización o asepsia de los tejidos vegetales, así como de los materiales para su manipulación. La asepsia evita la contaminación de los cultivos por microorganismos como bacterias y hongos. La propagación de plantas en condiciones *in vitro* se usa ampliamente y de forma exitosa con fines comerciales en todo el mundo (Sánchez, 2018). El siguiente aspecto importante del cultivo *in vitro* es el uso de reguladores de crecimiento o fitohormonas.

### **Uso de reguladores de crecimiento (RC)**

El uso de las fitohormonas o reguladores del crecimiento (RC) es esencial en el proceso de diferenciación celular. Las auxinas promueven la formación de callos. Algunas auxinas de las más comúnmente utilizadas en los medios de cultivo de tejidos vegetales son: ácido indol-3-acético (IAA), ácido indol-3-butírico (IBA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido 1 naftaleneacético (NAA). Mientras que las citoquininas más comúnmente utilizadas en los medios de cultivo son 6-bencilaminopurina o 6-benciladenina (BAP, BA), 6-de dimetilaminopurina (2iP), N- (2-furanilmetil) -1-purina-6-amina (cinetina), y 6- (4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilamino) purina (zeatina). Por lo general, tanto la auxina como la citoquinina se agregan a los medios de cultivo para obtener morfogénesis; sin embargo, las cantidades que se usan con frecuencia varían dependiendo de la especie de planta que se desea cultivar (Alamgir, 2017). Así, por ejemplo, en Papaya (*Carica papaya*) la auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) resultó ser el mejor compuesto para la inducción de callo, a una concentración de 5 mg/L (Zhao *et al.*, 2021).

### **Cultivo *in vitro* de *Vitis vinifera*.**

Una de las especies con mayor aprovechamiento en la propagación vegetal y bajo condiciones *in vitro* para el mejoramiento de sus características es *Vitis vinifera*, que tiene una gran importancia agronómica y económica por su fruto y su uso en la producción del vino. *Vitis vinifera* pertenece a la familia *Vitaceae* que incluye alrededor de 15

géneros y casi 900 especies y se cultiva principalmente en regiones de Europa, Asia, África y América (Wen, 2007). Los primeros ensayos en dormancia en *V. vinifera* fueron descritos por Kachru *et al.*, en 1961. Asimismo, han sido estudiados los efectos que tienen los diferentes reguladores de crecimiento (RC) sobre los tejidos cultivados, así como la diferenciación utilizando diferentes tejidos en los medios de cultivo (Diab *et al.*, 2011; Kinfe *et al.*, 2017). También se han descrito los procesos de diferenciación para la obtención de brotes y enraizamiento utilizando diferentes concentraciones de RC (Kumsa, 2016 y 2017; Sánchez, 2018; Stamp, 1990). No existe un protocolo general para la propagación *in vitro* de todas las variedades de *V. vinifera*, cada variedad responde de manera diferente (Cavazos, 2017; Kurmi *et al.*, 2011). El grado de respuesta depende en gran medida del genotipo particular, el ambiente de cultivo, el medio de cultivo, el tratamiento hormonal, así como del tejido cultivado (San Pedro *et al.*, 2017).

Sin embargo, hay un gran número de especies de vid pertenecientes a otros géneros de la familia *Vitaceae* conocidas en su mayoría como uvas silvestres que han sido menos estudiadas, algunas de ellas tienen características como mayor resistencia o tolerancia a plagas y enfermedades y tienen gran importancia para el potencial mejoramiento genético de *V. vinifera* (Das *et al.*, 2002). En el estado de Puebla se han reportado algunas vides silvestres (*Vitis* spp.), en particular en tres regiones del estado: Teziutlán, Atlixco y Tehuacán (Mora-Franco *et al.*, 2008). Uno de los géneros que comprende algunas de las variedades de uva silvestre alrededor del mundo es el género *Ampelocissus* que contiene alrededor de 95 especies la mayoría distribuidas en África, Asia y Europa. En América central hay cuatro especies de este género: *Ampelocissus acapulcensis* (Kunth) Planch., *Ampelocissus erdvendbergiana* Planch., *Ampelocissus javalensis* (Seem.) W. D. Stevens & A. Pool, y la especie *Ampelocissus robinsonii* Planch. El género se caracteriza por inflorescencias sostenidas por un zarcillo, un disco floral prominente generalmente con diez marcas lineales en su costado, y la frecuente asociación de pelos aracnoides oxidados en partes jóvenes de la planta (Chen y Manchester, 2007).

### **Estudios en el género *Ampelocissus***



Existe solo un informe sobre el cultivo *in vitro* en el género *Ampelocissus* el cual aborda solamente la inducción a callo a partir de hojas y tallo, así como un análisis de extractos metanólicos de las hojas y los callos inducidos utilizando cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (GC-MS). Para la inducción a callo utilizaron medio Murashige y Skoog y tres diferentes RG, 6-bencilaminopurina (BAP), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido naftalenacético (ANA), en diferentes concentraciones y combinaciones de 2, 4-D (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg / l), ANA (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg / l) y en combinación 2,4-D + BAP (0.5 + 1.0, 1.0 + 1.0, 1.0 + 0.5, 1.5 + 1.0 mg / l) y ANA + BAP (0.5 + 0.5, 0.5 + 1.0, 1.0 + 0.5, 1.0 + 1.0 mg / l) obteniendo el mejor resultado con el medio suplementado con BAP (0.5 mg / l) y ANA (1.0 mg / l) (Anand, 2018).

Otros estudios realizados en especies de este género van enfocados a los metabolitos secundarios que produce la planta y su potencial actividad biológica como antiinflamatorio, analgésico (Das *et al.*, 2014), antimicrobiano (Pednekar y Raman, 2013), antioxidante y anticancerígeno (Maheswari y Meerabai, 2018; Pettit *et al.*, 2008; Tamilarasi *et al.*, 2000; Zongo *et al.*, 2010). No obstante, a pesar de que la acción de los compuestos secundarios en la actividad microbiana y antiinflamatoria han sido ampliamente estudiados, se desconocen las condiciones para el establecimiento del cultivo *in vitro* del género *Ampelocissus*.

Existe poca información sobre el cultivo *in vitro* en el género *Ampelociccus* ya que solo se cuenta con información sobre la diferenciación a callo y no a la obtención de brotes o nuevos individuos a través del cultivo de tejidos. México cuenta con una gran diversidad de especies frutales de manera silvestre entre las cuales hay una gran cantidad de vides silvestres en el estado de Puebla y otros estados de la República. Una de ellas es la especie de uva silvestre *Ampelocissus acapulcensis*, conocida como *Vitis acapulcensis*. La especie *Ampelocissus* tiene aprovechamiento y valor etnobotánico en la región mixteca del estado de Puebla (Vidaña-Rodríguez *et al.*, 1996). Particularmente en la región de Jolalpan, Puebla, algunos pobladores emplean los frutos de la vid en la elaboración de vino (Comm. pers. Isaac Aguilar Bello, 12 de abril de 2019). Asimismo, esta especie tiene usos en la alimentación de los pobladores de algunas regiones de México, las hojas se emplean en la

preparación de platillos con carne molida (Salomón-Castaño *et al.*, 2012) y los frutos de esta vid silvestre tienen características fisicoquímicas propias, con un alto potencial futuro para su uso agroindustrial. En general, prácticamente no existe información sobre el aprovechamiento o conservación de este género y especie en México.

El objetivo del presente trabajo consistió en establecer un protocolo de cultivo *in vitro* para determinar las concentraciones de reguladores de crecimiento (RC) para la obtención de brotes de *A. acapulcensis* utilizando diferentes explantes de hojas jóvenes y utilizando diferentes RC como ácido naftalenacético (ANA), ácido indol-3-acético (IAA), Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D), 6-bencilaminopurina (BAP) y Kinetina.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Descripción de la especie de estudio**

*Ampelocissus acapulcensis* pertenece a la familia Vitaceae. Es un arbusto trepador que alcanza hasta 12 m de altura. Las flores del género son polígamo-monoicas o bisexuales. Las ramas son cilíndricas, con lenticelas dispersas aracnoides o glabras; hojas simples de pecíolos con vellosidades aracnoides o glabras; láminas subtriangulares, ápice agudo o acuminado, margen dentado y base cordada; láminas jóvenes vilosas en ambas caras, las hojas maduras son aracnoides y con pubérulas a lo largo de las nervaduras prominentes en la superficie abaxial, papiráceas. Inflorescencias grandes en panículas condensadas a densas, corola de pétalos rojos glabros, estambres rojos, ovario glabro. Las anteras son sulcadas, amarillas; ovario rojo y glabro; estilete nulo, el estigma puntual o discoidal. Las bayas color rojizas-moradas, subesféricas, púrpuras, lisas o con lenticelas oscuras esparcidas; semillas cordiformes, sulcadas lateralmente, hilio agudo, rafe inconspícuo, calaza marcada (Figura 1). Zarcillos ramificados dicotómicamente, con un ramo en cada ramificación, curvo (Lombardi, 1997, tomado de Vázquez Astudillo, 2011).



Figura 1. Frutos de *A. acapulcensis* (imágenes tomadas por Isaac Aguilar-Bello, 2019).

### **Obtención del Material vegetal**

Las primeras plantas para los ensayos de aclimatación en el invernadero de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y fueron donadas por el C. Abraham Isaac Aguilar Bello. Las plantas procedieron del municipio de Jolalpan, Puebla, en donde crecen de manera natural (Figura 2). Posteriormente, el C. Abraham donó aproximadamente 200 semillas a partir de las cuales se realizaron las pruebas de germinación y la obtención de las plantas empleadas en el cultivo *in vitro*.



*Figura 2. Plantas de A. acapulcensis utilizadas en este estudio y creciendo en el invernadero.*

### **Condiciones para el cultivo in vitro**

La preparación de 1 L de medio MS, consistió en pesar 4.43 g de medio MS basal medium (Sigma-Aldrich) y 20 de Sacarosa en una balanza analítica de la marca Witeg (modelo WBA 220). El medio MS y la sacarosa se colocaron en un vaso de precipitado de 1000 ml al cual se le agregaron 800 ml de agua tridestilada y el vaso se colocó sobre una placa de calentamiento con agitación magnética (marca Witeg Germany Labortechnik GmbH, modelo MaXterile 47, Korea) para que se disolvieran el medio MS y la sacarosa. Una vez disueltos el medio MS y la sacarosa, se agregaron diferentes combinaciones y concentraciones de hormonas y se ajustó el pH a  $5.78 \pm 0.01$  y se aforó a 1 L. Finalmente, se agregó 2.5 g/L de phytigel (Sigma-Aldrich). El medio fue calentado en un horno de microondas hasta disolver el phytigel completamente y 25 ml de medio fueron vertidos en frascos tipo Gerber de vidrio y cubiertos con tapas Magenta B-Cap (Sigma-Aldrich). Las tapas Magenta B-Cap cuentan con canales especiales que permiten el intercambio gaseoso. Los medios fueron esterilizados a 121 °C o 1 Kg/cm-2s-1 durante 15 minutos en autoclave (marca Witeg Germany Labortechnik GmbH, modelo MaXterile 47, Korea).

### **Preparación de reguladores de crecimiento (RC)**

Se utilizaron 5 reguladores de crecimiento (fitohormonas u hormonas vegetales) para inducir la diferenciación del tejido vegetal: 3 auxinas: ácido naftalenacético (ANA por sus siglas en español y NAA por sus siglas en inglés), ácido indol-3-acético (AIA por sus siglas en español y IAA por sus siglas en inglés) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); y dos tipos de citoquininas: 6-bencilaminopurina (BAP por sus siglas en español, BA por sus siglas en inglés) y kinetina. Todos los reguladores eran de la marca Sigma-Aldrich. La solución de ácido giberélico (AG) se preparó a partir de Activol al 40% de GA, de venta comercial.

La solución de ácido giberélico se preparó a partir de 2.5 g del producto comercial marca Activol (40% AG) y se disolvió en 100 ml de etanol absoluto, para obtener una concentración Stock de 10 mg/ml. Posteriormente, 1 ml de la solución Stock obtenida se disolvió en 10 ml de agua para obtener una solución de trabajo a una concentración final de 1 mg/ml, la cual se almacenó a 4°C hasta su utilización.

### **Selección del material y desinfección**

El material vegetal que se utilizó en el presente trabajo consistió en hojas de *Ampelocissus acapulcensis*. Las hojas que se utilizaron fueron hojas nuevas, de la segunda y tercera en la posición de la filotaxia. Se seleccionó el tejido vegetal que presentaba mayor tamaño y color verde claro. Las plantas crecieron en los invernaderos de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) a temperatura ambiente.

El proceso de desinfección del material vegetal se realizó en la campana de flujo laminar previamente esterilizada con alcohol al 70% e incidencia por 15 minutos de luz ultravioleta. El tratamiento de desinfección constó de los siguientes pasos: 1) el material vegetal se sumergió en un frasco de vidrio estéril con etanol al 70 % durante 30 segundos, posteriormente, 2) el material vegetal se traspasó con pinzas a la solución de cloro al 10 % donde se mantuvo durante 10 minutos; 3) una vez transcurrido el tiempo en la solución de cloro, el material vegetal se tomó con unas pinzas estériles y se traspasó a un frasco de vidrio con agua tridestilada estéril para enjuagar, permaneciendo las hojas inmersas durante diez minutos. Este proceso de enjuague se repitió dos veces más para un total de tres enjuagues.

### **Siembra de los explantes**

Las hojas cortadas y desinfectadas se manejaron dentro de la campana de flujo laminar. Una vez que se decantó el último enjuague el material se mantuvo en un frasco de vidrio hasta su siembra. Posteriormente con ayuda de pinzas, bisturí y una placa de vidrio, previamente esterilizados, se tomó cada hoja con las pinzas y se colocó sobre la placa de vidrio para separar la parte del pecíolo con ayuda del bisturí y se procedió a hacer cortes de hoja de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>.

Los explantes de hoja se sembraron en medio MS con diferentes combinaciones de fitohormonas vegetales obteniendo un total de 8 tratamientos: A, B, C, D, E, F, G y H, más el grupo control. Cada tratamiento tuvo 4 diferentes concentraciones (Cuadro 1).

Tratamiento/ combinación de reguladores de crecimiento (RC)	Concentración (mg/l) de citocinina	Concentración (mg/l) de auxina
Control	ninguna	ninguna
A	0.5 mg/l de BAP 1 mg/l de BAP 1.5 mg/l de BAP 2 mg/l de BAP	1 mg/l de ANA 1 mg/l de ANA 1 mg/l de ANA 1 mg/l de ANA
B	0.5 mg/l de BAP 1 mg/l de BAP 1.5 mg/l de BAP 2 mg/l de BAP	1 mg/l de AIA 1 mg/l de AIA 1 mg/l de AIA 1 mg/l de AIA
C	0.5 mg/l de BAP 1 mg/l de BAP 1.5 mg/l de BAP 2 mg/l de BAP	1 mg/l de 2,4-D 1 mg/l de 2,4-D 1 mg/l de 2,4-D 1 mg/l de 2,4-D
D	0.5 mg/l de BAP 1 mg/l de BAP 1.5 mg/l de BAP 2 mg/l de BAP	
E	0.5 mg/l de KIN 1 mg/l de KIN 1.5 mg/l de KIN 2 mg/l de KIN	1 mg/l de ANA 1 mg/l de ANA 1 mg/l de ANA 1 mg/l de ANA
F	0.5 mg/l de KIN 1 mg/l de KIN 1.5 mg/l de KIN 2 mg/l de KIN	1 mg/l de AIA 1 mg/l de AIA 1 mg/l de AIA 1 mg/l de AIA
G	0.5 mg/l de KIN 1 mg/l de KIN 1.5 mg/l de KIN 2 mg/l de KIN	1 mg/l de 2,4-D 1 mg/l de 2,4-D 1 mg/l de 2,4-D 1 mg/l de 2,4-D

H	0.5 mg/l de KIN 1 mg/l de KIN 1.5 mg/l de KIN 2 mg/l de KIN	
---	--	--

*Cuadro 1. Tratamientos aplicados para la inducción a la formación de callos a partir de explantes de hoja.*

Los fragmentos de hoja y peciolo de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, fueron sembrados en los frascos respectivos con cada uno de los tratamientos arriba mencionados. Se sembraron seis frascos por cada tratamiento colocando 4 a 6 explantes en cada frasco (Figura 3). Los explantes fueron incubados en la cámara de crecimiento la cual fue adaptada en el laboratorio incorporando, un sistema de iluminación led, con lámparas que emiten luz roja y azul del espectro visible (marca BNSDMM, 45 Watts, área de irradiación: 2 M / 0.8m<sup>2</sup>). La luz azul permite que crezcan las hojas verdes y la luz roja favorece la floración. Se adaptó un control inteligente de Temperatura Digital (Shenzhen Meihang Technology, modelo MH1210W, China) para mantener una temperatura constante de 32 °C durante el día y 22 °C durante la noche y con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (mantenido por un reloj electrónico digital (marca JA para Riel DIN, modelo JA-1670, China). El cambio de medio de los explantes se realizó cada 15 días para evitar la contaminación y estrés oxidativo de las explantes sembrados en el medio MS. Al finalizar 45 días, después de la siembra inicial de los explantes, se procedió a medir la longitud y ancho alcanzado para cada uno de los callos empleando un vernier digital (OBI, modelo 215140, precisión 0.01 mm). Únicamente se realizó una medición de los callos al termino de los 45 días de crecimiento.



*Figura 3. Explantes de hoja sembrados en medio MS suplementado con diferentes reguladores de crecimiento.*

### **Análisis estadístico de los datos**

El análisis del largo y ancho de los callos alcanzados por los tratamientos se realizó por un análisis de varianza (ANOVA) El largo de la inducción a callo final se expresó como la media  $\pm$  error estándar (EE) para todos los tratamientos utilizados. Se empleó una ANOVA de una vía para identificar si había una diferencia significativa en la inducción de callos entre los tratamientos respecto al grupo control, encontrando una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). Posteriormente, se empleó una ANOVA de dos vías para contrastar el efecto de la combinación de fitohormonas (tratamientos A, B, C, D, E, F y G) vs. la concentración empleada. Se realizó la prueba HSD de Tukey para comparaciones múltiples para determinar diferencias significativas entre los tratamientos y entre concentraciones ( $P < 0.05$ ). El largo y ancho obtenido de la inducción a callo final se expresó en los gráficos como la media  $\pm$  error estándar (EE) para todos los tratamientos utilizados. Los análisis estadísticos se realizaron con dos programas estadísticos: 1) programa R (versión 3.6.1, 2019-07-05, Copyright © 2019. The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URI, <https://www.R-project.org>,



accesado en junio 2022) y con el programa JMP (versión 10, SAS Institute, Cary, NC, USA).

## RESULTADOS

### **Efecto de las combinaciones de reguladores de crecimiento (RC) y el uso de diferentes concentraciones en la diferenciación a callo.**

La transición de hojas a callos se comenzó a notar a partir del día 21 después de la primera siembra en todos los tratamientos. Al término de 45 días se tomaron los datos finales de la longitud de los explantes.

Se probó el uso de una única concentración 1mg/L de BAP y kinetina por separado (tratamientos D y H) para la transformación de explantes de hoja a callos, pero en ambos medios de cultivo no se originaron callos, lo mismo sucedió en el grupo control de este experimento. La comparación estadística mediante ANOVA de dos vías mostró primeramente un efecto significativo en alguno de los tratamientos y en al menos una de las concentraciones ( $F_{0.05 (1,432)} = 5.1905$ ,  $P < 0.0001$ ). Cabe resaltar que el ANOVA se realizó únicamente con los tratamientos que combinaron auxina y citocinina: tratamientos A, B, C, E, F y G. Asimismo, las comparaciones estadísticas al interior de cada uno de los dos factores (tratamiento por combinación de fitohormonas y su concentración), mostraron efectos estadísticamente significativos en cada factor, así como para la interacción (Cuadro 2). Por lo tanto, a longitud de los callos formados varió en tamaño de acuerdo con las diferentes combinaciones de auxina y citocinina empleada y con la concentración que se aplicó (Figura 4, cuadro 2). Asimismo, el efecto significativo de la concentración depende del tipo de tratamiento empleado, es decir de la interacción (Cuadro 2).

El análisis a posteriori (prueba de Tukey) indicó que los tratamientos A, C y G producen los callos de mayor longitud al final de la medición, seguido de los tratamientos B y E. Finalmente el tratamiento F produjo los callos más pequeños al realizar la medición (Figura 5). Cabe mencionar que algunos explantes de los tratamientos E y F se dejaron por quince días adicionales y se observó que los callos continuaron creciendo, aunque no alcanzaron la misma talla de los explantes en los tratamientos

A, B y G, el crecimiento fue visiblemente menor. De tal forma que posiblemente los tratamientos E y F actúan con una menor velocidad sobre los explantes. Los explantes en el tratamiento control mostraron nula diferenciación.

Asimismo, el análisis a posteriori (Tukey-Kramer) para las cuatro concentraciones, indicó que las concentraciones 1, 2 y 3 producen la mayor longitud de callos (0.5, 1.0 y 1.5 mg/l) en contraste con la concentración 4 (2 mg/l) que produjo los callos de menor longitud (Figura 6).

Cabe resaltar que el tamaño del callo obtenido y medido durante la diferenciación corresponde únicamente a tejido diferenciado completamente; es decir, el área correspondiente a la hoja ya no fue perceptible como hoja, sino como tejido diferenciado.

*Cuadro 2. ANOVA de dos vías (tipo II, modelo desbalanceado). Se contrastaron seis tratamientos (A, B, C, E, F y G) y cuatro concentraciones (0.5, 1, 1.5 y 2 mg/L de citocinina con 1 mg/l de auxina).*

Efecto	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F	P
Tratamiento	5	15.1416	14.8518	<.0001*
Concentración	3	4.3490	7.1097	0.0001*
Tratamiento × concentración	15	6.2753	2.0518	0.0113*

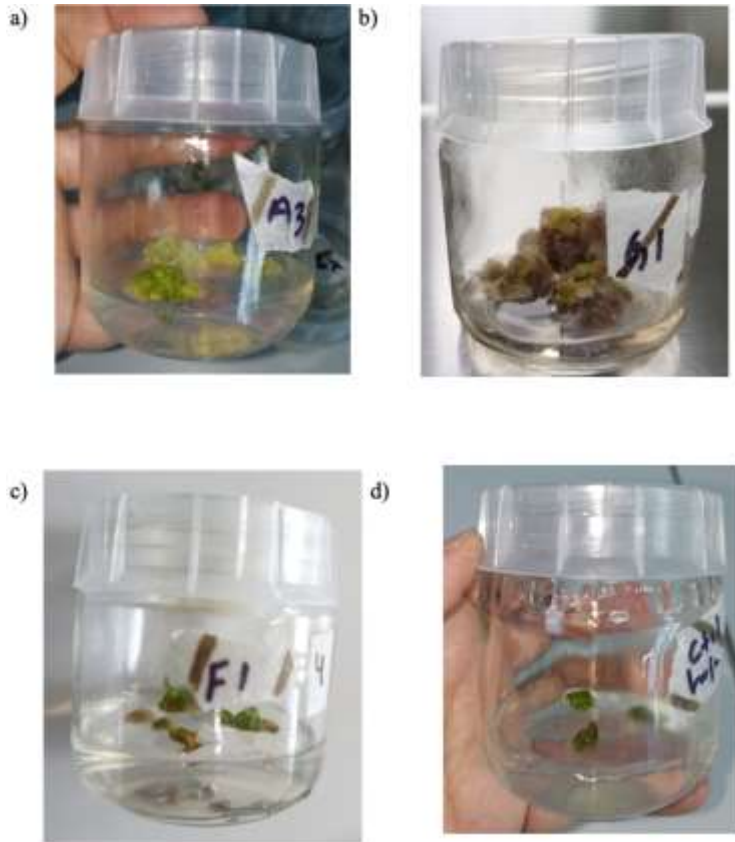


Figura 4. Se muestra la respuesta en algunos de los tratamientos con mayor desarrollo de callos (letra a y b, tratamientos A y G, respectivamente) y tratamiento con baja respuesta (letra c, tratamiento F). En contraste, el control no mostró diferenciación alguna de tejido ante la falta de fitohormonas, de acuerdo con lo indicado en cuadro 1.

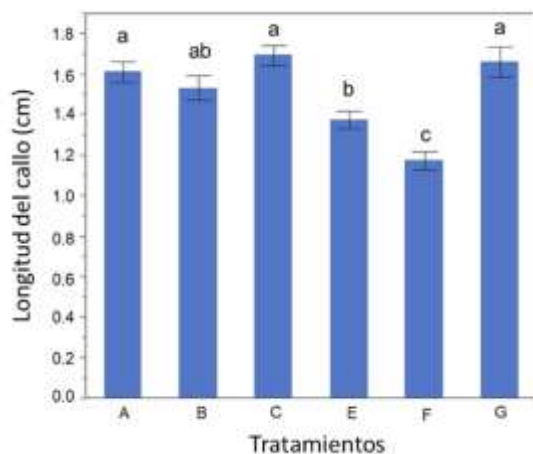
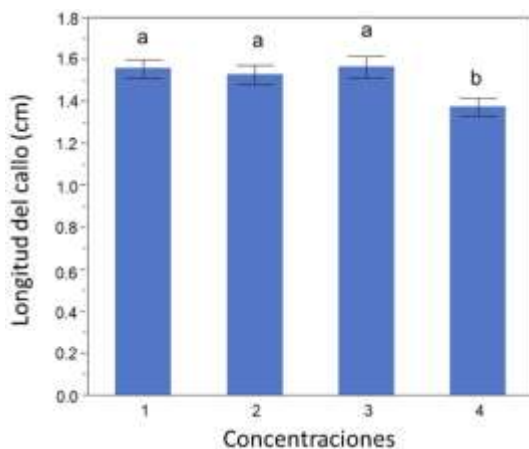


Figura 5. Efecto de la inducción de explantes de hoja a callo cultivados en medios MS suplementados con dos citocininas BAP (Tratamientos A, B, C) y KIN (tratamientos E, F, G) combinados con 1 mg/L de ANA (tratamientos A y E), AIA (tratamientos B y F) y 2, 4-D (tratamientos C y G). El ANOVA de dos vías mostró diferencia significativa entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ). Se realizó la prueba a



posteriori de Tukey-Kramer, letras diferentes indican diferencias estadísticas.

Figura 6. Efecto de la concentración en la diferenciación a callo a partir de tejido foliar. Posterior al efecto significativo de la concentración en el ANOVA de dos vías, se realizó la prueba de Tukey-Kramer. Letras distintas indican diferencias significativas. Donde: 1) 0.5 mg/l, 2) 1 mg/l, 3) 1.5 mg/l y 4) 2 mg/l de la citocinina

(BAP o KIN), de acuerdo con los tratamientos y concentraciones indicados en el Cuadro 1.

## DISCUSIÓN

La diferenciación a callo mediante cultivo *in vitro* del género *Ampelocissus* está poco estudiada. Los actuales estudios en el género provienen de la parte de Asia y se basan en el aprovechamiento de los compuestos bioactivos que las plantas contienen para uso medicinal. El único estudio registrado para la diferenciación a callo de este género se realizó en la especie *Ampelocissus latifolia* utilizando una citocinina BAP y dos auxinas ANA y 2, 4-D por separado y en combinación, obteniendo un mejor resultado para la obtención de callos a partir de explantes de hoja con la combinación 0.5 mg/L de BAP+ 1mg/L de ANA (Anand *et al.*, 2018). De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, se confirmaron los resultados encontrados por Anad y colaboradores, el tratamiento A (BAP con ANA) en la concentración 1, fue uno de los tratamientos que produjeron callos de mayor longitud en *A. acapulcensis*.

Los resultados en este estudio mostraron que la formación de callos a partir de explantes de hojas en *A. acapulcensis* se vio favorecida en cuatro combinaciones de reguladores del crecimiento (RC) o tratamientos (BAP+ANA, BAP+AIA, BAP+2,4-D, KIN+2,4-D). Asimismo, hubo un efecto de las concentraciones de BAP y KIN a 0.5, 1, 1.5 y en menor grado 2 mg/l en combinación con 1mg/l de ANA, AIA y 2,4-D, siendo en ésta última concentración, que la longitud de callo fue significativamente menor con respecto a las otras tres concentraciones. Ozden y Karaaslan (2011), mencionan que concentraciones bajas de BAP tienen un papel clave en la proliferación y el crecimiento de los callos en la uva (*Vitis vinifera* L. cv. 'Bogazkere) en combinación con auxinas, y que el aumento en las concentraciones de BAP no tuvo una diferencia con el aumento de tamaño en los callos, lo que concuerda con lo encontrado en este experimento para la concentración de 2mg/l. Por otra parte, Diab *et al.*, (2011) reportan que la kinetina tiene un efecto menor en el crecimiento de callos en comparación con BAP. Los resultados en el presente estudio muestran que tanto BAP como kinetina pueden tener un buen efecto en la diferenciación, dependiendo de la combinación con las auxinas ANA y 2,4D.

Los tratamientos E y F, y que contenían kinetina, mostraron los callos de menor longitud. Sin embargo, observamos que al dejar los tratamientos E y F por un tiempo mayor, continuó el desarrollo de los callos; aunque al final el tamaño obtenido fue menor al que tuvieron los callos en los tratamientos con mejor respuesta (A, B y G).

Asimismo, las combinaciones de RC utilizadas en este experimento coinciden con otros trabajos. Pehlivan y colaboradores (2017) encontraron que la combinación de 0.5 mg/l de BAP + 1 mg/l de 2,4-D tiene un mayor efecto en la inducción de callos en explantes de disco foliar en ‘Sultana’ *Vitis vinifera* L. Asimismo, en otros estudios se menciona que el aumento en la concentración de 2,4-D y la disminución de BAP favorece tanto el tamaño como el número de callos producidos a partir de explantes de hoja (Khan *et al.*, 2015). En el presente estudio, la utilización aislada de diferentes concentraciones de las citocininas BAP, y KIN, así como la ausencia de cualquier RC en el medio MS (control), no mostraron ningún grado de diferenciación en los explantes. Sin embargo, en otros experimentos en plantas del género *Vitis*, si se han reportado la obtención de callos utilizando únicamente medio de cultivo sin RC y utilizando únicamente citocininas. Jaskani y colaboradores en 2008 obtuvieron callos en la variedad de uva Perlette (*Vitis vinifera* L.) utilizando solamente BAP, obteniendo hasta un 80% y 50% de callos utilizando BAP a 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M para explantes de tallo, mientras que en segmentos nodales no se diferenciaron en ningún tratamiento. En otro estudio donde se utilizaron tallos jóvenes de la variedad de uva Shiraz (*Vitis vinifera* L.), pudieron obtener un 60% de callos sin RC en medio de cultivo WPM (Woody Plant Medium) y un 40% de callos en medio WPM con BAP en una concentración de 1 mg/l (Arieswari *et al.*, 2018), por lo que la obtención de callos inducida con citocininas depende mucho del explante utilizado, ya que en los tallos de las plantas puede haber una mayor cantidad de RC endógenos, en comparación con las partes de la hoja, lo cual puede estar involucrado la inducción a los callos (Abido *et al.*, 2013; Amirí *et al.*, 2019). En el presente estudio, no se emplearon tallos, únicamente hojas, aunque no se descarta un posible efecto positivo en la producción de callos a partir de tallos empleando las fitohormonas BAP y kinetina. No obstante, observamos que la diferenciación obtenida para los tratamientos D (BAP) y H (kinetina) solos, es decir sin auxina,

tuvieron nula diferenciación en ambos tratamientos. Posiblemente, estas diferencias son particulares para cada especie involucrada. *Vitis* y *Ampelocissus* son géneros que pertenecen a la misma familia, Vitaceae; sin embargo, posiblemente existen diferencias a nivel de género en la respuesta a las distintas fitohormonas.

Los resultados de esta investigación tienen alcance en estudios con aplicación biotecnológica, en el mejoramiento de las especies de la familia Vitaceae y en particular en el aprovechamiento del género *Ampelocissus*. Las uvas de la vid silvestre *A. acapulcensis* son grandes, y con astringencia alta, esta propiedad se refleja en la producción de vino local. Aunado a ello, la especie *A. acapulcensis* tiene una muy baja tasa de reclutamiento por la vía sexual. Los resultados muestran que existe una posibilidad en el uso de fitohormonas para aumentar el número de organismos mediante técnicas de cultivo *in vitro*, así como el empleo de distintas combinaciones de fitohormonas y a diferentes concentraciones.

## CONCLUSIONES

El resultado del análisis estadístico mostró que la exposición a distintas combinaciones de citoquininas (BAP y Kinetina) en combinación con diferentes auxinas (ANA, AIA y 2,4-D) afecta significativamente la longitud de los callos. Los medios de cultivo adicionados con BAP en combinación con ANA y 2,4-D, así como, kinetina en combinación con 2,4-D mostraron el mayor efecto en la diferenciación a callo en explantes de hoja después de los 45 días de incubación, rebasando los 1.5 cm de longitud en promedio.

Las concentraciones de 0.5, 1, 1.5 mg/l de BAP y KIN en combinación con 1mg/l de ANA, AIA 2,4-D desarrollan callos de mayor longitud en una primera fase de la formación de callos.

El uso de reguladores de crecimiento empleados en la diferenciación y obtención de callos de *A. acapulcensis* es efectiva para lograr la propagación asexual por métodos indirectos.

## REFERENCIAS

- Abido, A.I.A., Aly M.A.M., Hassanen, S.A., Rayan, G.A., (2013). *In vitro* propagation of grapevines (*Vitis Vinifera* L.) Muscat of Alexandria cv. for conservation of endangerment. Middle-East. *Journal of Scientific Research*, 13(3), 328-337.
- Alamgir, A. N. M. (2017). Cultivation of Herbal Drugs, Biotechnology, and In vitro Production of Secondary Metabolites, High-Value Medicinal Plants, Herbal Wealth, and Herbal Trade. Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts. Progress in Drug Research. Springer, 73, 380-452.
- Amirí, S., Mohammadi, R., Akbari, R. (2019). The Effects of Cytokinin and Auxin Interactions on Proliferation and Rooting of Seedless Grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. ‘Sultanine. *Erwerbs-Obstbau* 61, 85-95
- Anand, D.C., Meena, R., Patni, V. (2018). *In vitro* callus induction and comparative GC-MS analisis of methanolic extracts of callus and leaf simples of *Ampelocissus latifolia* (Roxb.) Planch. *Int J Pharm Pharm Sci*, 10 (9), 68-72.
- Arieswari, N.N.N., Astarimi, I.A., Astiti, N.P.A., Pramana, J., (2018). *In vitro* callus induction of “Shiraz” grape (*Vitis vinífera* L.) using different médium growth regulator combination. *International Journal of Biosciences and Biotechnolog*, 6(1), 25-33.
- Bathia, S. & Bera, T. (2015). Somatic Embryogenesis and Organogenesis. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Academic Press.
- Castillo, A. (2004). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. INIA Serie Actividades de Difusión, 382. Las Brujas, Canelones, INIA, Uruguay, 8pp.
- Cavazos, G. J. M. (2017). Propagación *in vitro* de los cultivares de vid (*Vitis vinífera* L.) cabernet sauvignon y merlot. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de agronomía.
- Chen, I., Manchester, S. (2007). Seed morphology of modern and fossil *Ampelocissus* (Vitaceae) and implications for phylogeography. *American Journal of Botany*, 94(9), 1534–1553.



- Das, D. K., Reddy, M. K., Upadhyaya, K. C., Sopory, S. K. (2002). An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell*, 20, 999–1005.
- Das, B. K., Fatema, U. K., Hossain, M. S., Rahman, R., Akbar, M. A., Uddin, F. (2014). Analgesic and Anti-inflammatory Activities of the Fruit Extract of *Ampelocissus latifolia* (Roxb) on Laboratory Animals. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 4(12), 1477-1485.
- Diab, A.A., Khalil, S.M., Ismail, R.M. (2011). Regeneration and micropropagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) through shoot tips and axillary buds. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 2(4), 484-491.
- Franco-Mora, O., Cruz-Castillo, J. G., Cortés-Sánchez, A. A., Rodríguez-Landero, A. C. (2008). Localización y usos de vides silvestres (*Vitis* spp) en el estado de Puebla, México. *Ra Ximhai*, 4(1), 151-165.
- Jaskani, M. J., Abbas, H., Sultana, R., Khan, M. M., Qasim, M., Khan, I. A. (2008). Effect of grow hormones on micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. Perlette. *Pak. J. Bot.*, 40(1), 105-109.
- Kachru, R. B., Singh, R. N., Yadav, I. S. (1972). Physiological studies on dormancy in grape seeds (*Vitis vinifera* var. Black Muscat). *Vitis*, 11, 289-295.
- Khan, K., Ahmed, M., Hafiz, I., Abbasi, N., Ejaz, S., Anjum, M. (2015) optimizing the concentrations of plant growth regulators for *In vitro* shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 49, 37-45.
- Kinfe, B., Feyssa, T., Bedada, G. (2017). *In vitro* micropropagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from nodal culture. *Afr. J. Biotechnol.*, 16 (43), 2083-2091.
- Kumsa, F. (2016). Review on *In vitro* regeneration of some selected grapevines (*Vitis vinifera* L.) cultivars from shoot and leaf culture. *Journal of Natural Sciences Research*, 6 (23), 46-51.
- Kumsa, F. (2017). Effect of growth regulators on indirect organogenesis of two grapevines (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Afr. J. Biotechnol.*, 16(6), 852-859.
- Kurmi, U.S., Sharma, D.K., Tiwari, R., Baghel, B.S., Tiwari, S. (2011). Plant regeneration of *Vitis vinifera* (L) via direct and indirect organogenesis

- from cultured nodal segments. *Journal of Agricultural Technology*, 7(3), 721-737.
- Lombardi, J. A. (1997). Types of names in *Ampelocissus* and *Cissus* (Vitaceae) referring to taxa in the Caribbean, Central and N. America. *Taxon*, 46(3), 423-432.
- Maheswari U. B., Meerabai R. S. (2018). Antioxidant activity of methanol extract of *Ampelocissus araneosa* planch (Vitaceae). *International Journal of Current Research in Life Sciences*, 7(4), 1555-1559.
- Ozden, M., Karaaslan. (2011). Effects of cytokinin on callus proliferation associated with physiological and biochemical changes in *Vitis vinifera* L. *Acta Physiol Plant*, 33,1451-1459.
- Pednekar. P.A., Raman. B. (2013). Antimicrobial and Antioxidant Potential with Ftir Analysis of *Ampelocissus latifolia* (Roxb.) Planch. LEAVES. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(1), 157-162.
- Pehlivan, E.C., Kunter, B., Royandazagh, S.D. (2017). Choise of explant material and media for *in vitro* callus regeneration in Sultana grape cultivar (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 2, 30-34.
- Pettit, G. R., Mukku, V. J. R. R., Cragg, G., Herlad, D. L., Knight, J. C., Herald, C. L., Chapuis, J. C. (2008). *Ampelocissus* sp. Cancer cell growth inhibitory constiturnts. *Journal of Natural Products*, 71(1).
- Salomón-Castaño, J., Cruz-Castillo, J. G., Franco Mora, O. y Rubí-Arriaga, M. (2012). *Potencial agroindustrial y culinario*. En: La vid silvestre en México. Actualidades y potencial. O. Franco-Mora y J. G., Cruz-Castillo, Eds. Universidad Autónoma del Estado de México. Altres-Costa Amic Editores. Toluca, México. 134 pp.
- San Pedro, T., Peiro, R., Villanova, J., Olmos, A., Gisbert, C. (2017) *In vitro* propagation of *Vitis vinifera* L. cv. ‘Monastrell’. *Electron J. Biotechnol*, 27, 80-83.
- Sánchez, M. E. A. (2018). Desarrollo de un sistema para la microinjertación *in vitro* de vid. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Aguascalientes, centro de ciencias básicas departamento de química.
- Stamp, J.A., Colby, S.M., Meredith, C.P. (1990). Direct shoot organogenesis and plant regeneration from leaves of grape (*Vitis* ssp.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 22, 127-133.

- Tamilarasi, C. T., Subasini, U., Kavimani, S., Jaykar, B. (2000). Phytochemical and Pharmacological Evaluation of *Ampelocissus Latifolia*. *Ancient Science of Life*, 20 (1), 14-18
- Vázquez Astudillo, B. A. (2011). Estudio etnobotánico de la flora medicinal utilizada en el control de la diabetes tipo 2 en la comunidad de agua de perro, municipio de Acapulco de Juárez, Guerrero, México. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Ciudad de México.
- Vidaña-Rodríguez, J. M., E. Guízar N. y D. Granados S. (1996). Autoecología y aprovechamiento de la uva silvestre (*Ampelocissus acapulcensis* (H.B.K.) Planch.) en el municipio de Jolalpan, Puebla. *Revista de Geografía Agrícola*, 23, 23.
- Wen, J. (2007). The Families and Genera of Vascular Plants. Springer-Verlag. Berlin. 9. 466–478.
- Yildiz, M. (2012). The Prerequisite of the Success in Plant Tissue Culture: High Frequency Shoot Regeneration. Recuperado de: <https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/the-prerequisite-of-the-success-in-plant-tissue-culture-high-frequency-shoot-regeneration>.
- Zhao, X., Zhao, X., Song, J., Zeng, Q., Ma, Y., Fang, H., Yang, L., Deng, B., Liu J., Fang, J., Zuo, L. y Yue J. (2021). Auxin and cytokinin mediated regulation involved *in vitro* organogenesis. *Journal of Plant Physiology*, 260:153405.
- Zongo, C., Savodogo, S., Ouattara, L., Bassole, I. H. N., Ouattara, C. A. T., Ouattara, A. S., Barro, N., Koudou, J., Traore, A. S. (2010). Polyphenols content, Antioxidant and Antimicrobial activities of *Ampelocissus grantii* (Baker) Planch. (Vitaceae): A Medical plant from burkina faso. *International Journal of Pharmacology*, 6(6), 880-887.

## Capítulo 9

### Revisión documental de las diferentes formas de inoculación para inducir la formación de agallas de *Ustilago maydis* en maíz.

Daniel Sihuanca Mendoza<sup>1\*</sup>, Noé Coba de la Cruz<sup>1</sup>, María Leticia  
Calderón Fernández<sup>2</sup>, Agustina Rosa Andrés-Hernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Blvd. Valsequillo y Av. San Claudio, Edificio BIO-2, Ciudad Universitaria, Col. Jardines de San Manuel, Puebla, Pue. México, C:P: 72570

<sup>2</sup>Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Av. San Claudio y 18 sur, Edificio FIQ7-306, Ciudad Universitaria, Col. Jardines de San Manuel, Puebla, Pue. México, C:P: 72570

\*Autor de correspondencia: daniel.sihuanca@correo.buap.mx

#### RESUMEN

Se realiza un estudio bibliográfico de los diferentes procesos de inoculación del maíz con el hongo parasito denominado como huitlacoche (*Ustilago maydis*). El huitlacoche es un hongo basidiomycete del maíz de tipo reproductivo heterotálico bifactorial tetrapolar oportunista que infecta el maíz. Desde tiempos prehispánicos se ha utilizado como alimento y en la actualidad se han encontrado varias propiedades nutricionales y medicinales, por lo que es de suma importancia en la producción de hongos comestibles. Por todo esto, es importante llevar a cabo una recopilación de la información necesaria desde el punto de vista documental para enlistar una metodología asertiva para la producción de este hongo. Con este trabajo se concluye que el mejor método de propagación es por medio líquido, utilizando la inoculación por inyección después de los 5 días de haber brotado el elote, siendo los maíces criollos y dulces los más susceptibles para la producción de huitlacoche.

**Palabras clave:** Estudio bibliográfico, cepas, huitlacoche, elote.

## INTRODUCCIÓN

El huitlacoche o también conocido como carbón del maíz (*Ustilago maydis*) es un hongo parásito del maíz. Este hongo se ha consumido tradicionalmente como alimento o condimento desde tiempos prehispánicos. Además, se prepara de diversas formas y es agradable al paladar. Es muy común encontrarlo en el mercado ya sea fresco o procesado.

Actualmente la demanda de este hongo ha aumentado considerablemente, tanto en el ámbito nacional como internacional. En Estados Unidos, donde ha adoptado una gran cantidad de nombres como “Hongo del maíz”, “Trufa Mexicana”, “Caviar Azteca” o “Maizteca” (Pataky, 1991), presenta una gran demanda. Por lo que, los productores e investigadores se han dado a la tarea de buscar diferentes alternativas, para la producción de este hongo. Sin embargo, muchas de las propuestas presentadas en dichos trabajos, representan altos costos y son de difícil acceso. Por lo que, los productores de escasos recursos no siempre suelen tener los resultados esperados debido a la falta de información. Estos métodos de inducción aún siguen siendo rudimentarios, como es el caso de la aspersión de teliosporas sobre los elotes en etapa inicial en campo.

Por otro lado, a pesar de que existen algunos métodos para mejorar los resultados en la infección, estos son caros y necesitan de instalaciones con condiciones relativamente estrictas y costosas para manipular este hongo.

Por ello, el objetivo de este trabajo fue realizar una recopilación literaria, clasificación y descripción de diferentes técnicas y estrategias para la producción de “Huitlacoche” (*U. maydis*), dando a conocer la estrategia que permita brindar una mejor viabilidad en la producción de este producto. De manera paralela, brindar una tecnología sencilla y factible de emprender y producir huitlacoche.

## ANTECEDENTES

El reino Fungi presenta una amplia biodiversidad cuyas actividades ecológicas son cruciales en todos los ecosistemas, reflejándose en la gran variabilidad morfológica que presentan. Son organismos eucariontes

filamentosos heterótrofos, presentan crecimiento apical, no poseen clorofila, presentan reproducción asexual y sexual por medio de esporas, su pared celular está constituida por quitina o celulosa (Herrera y Ulloa, 1998), cuya clasificación es cambiante frecuentemente, por lo que son considerados polifiléticos (Aguierre-Acosta *et al.*, 2014).

Los hongos desempeñan un papel importante asegurando el funcionamiento equilibrado de los ecosistemas, el cual es imprescindible para el desarrollo de plantas, animales y otros organismos (Piepenbring y Cáceres, 2019). Los hongos patógenos de plantas llevan a cabo una serie de estrategias para evitar las respuestas de defensas de la planta y necrosar rápidamente a las células; dentro de estos, uno de los grupos más importantes son los basidiomicetos (Camarena, 2001).

La clase de los basidiomycetes agrupa los hongos más evolucionados, donde están algunos de los patógenos de plantas más importantes. En esta clase se caracteriza por la formación de basidios, estructuras tubulares o en forma de clava y sus esporas sexuales o basidiosporas (Islas, 1994).

*Ustilago maydis* es un hongo basidiomicete que pertenece a los Ustilaginales, los cuales son un grupo de hongos fitopatógenos (Ruíz, 2008), es el agente causante de la enfermedad que produce el huitlacoche, una enfermedad exclusiva del maíz (*Zea mays L.*) (Ruíz, 2008). De igual forma, la variedad del maíz es un factor para que el hongo se desarrolle, siendo el maíz dulce el más susceptible (Christensen, 1963; Vanegas, 1995). Las agallas albergan una masa oscura, pulverulenta de teliosporas conocidas como esporas del carbón (Banuett, 1992). Esto ocasiona un retraso en el crecimiento de las plantas de *Z. mays* provocando un bajo rendimiento en la producción, y consecuentemente, generando importantes pérdidas económicas (Martínez-Espinoza *et al.*, 2002). En México el huitlacoche no representa una plaga, ya que tiene un valor comercial, dando su uso en la gastronomía local del país. Por lo que este organismo se ha destacado tanto en el ámbito comercial como científico para producirlo de manera sistemática, debido a sus características sensoriales, nutricionales y medicinales (Ruiz, 2008).

*Ustilago maydis* es un hongo polimórfico, ya que presenta dos formas durante su desarrollo, la primera de ellas es la forma haploide, la cual es unicelular y no es patógena, mientras que la segunda forma es

dicariótica, filamentosa y requiere de un hospedero para su “crecimiento” (Klosterman, 2007). De tal forma que durante su ciclo de vida se distinguen dos fases: la primera es saprofítica de crecimiento levaduriforme haploide, se reproducen por gemación (también llamadas esporidias) y una segunda como invasor con desarrollo del micelio, es decir, el hongo crece en forma de hifas dicarióticas, las cuales únicamente se desarrollan en el interior del huésped. Esta fase inicia con el apareamiento de dos células compatibles cuyo *loci* es de apareamiento sexual *a* y *b*. El acercamiento de estas células compatibles genera un bloqueo de la gemación y formación de filamentos delgados, los cuales son tubos de conjugación. Estos se atraen por acción quimiotrópica para luego fusionarse en el extremo apical formando el micelio dicariótico infeccioso, el cual crece hasta invadir al huésped a través de los estomas, órganos florales o por medio de la formación de un aprensorio (Caltrider y Gottlieb 1965; Banuett y Herskowitz, 1996; Kämper *et al.*, 2006); y finalmente dará la formación de agallas de una coloración negra (Agrios, 2005).

Recientemente, el huitlacoche ha sido considerado como un cultivo alternativo debido a su popularidad como alimento, incluso se ha introducido en la alta cocina, por lo que, se ha generado un incremento en su aceptabilidad, esto se podría deber, por un lado, a su alto valor nutricional, pero principalmente, por su excelente sabor (Martínez *et al.*, 2008). Además de su importancia económica, ya que su costo va de 40-140 pesos por kg (Central de Abastos de la Ciudad de México, 2007).

El huitlacoche es un alimento con un alto valor nutricional por su contenido proteico (10-20 %), su rico contenido de carbohidratos (55.1-66.5 %), fibra (16.0-23.5 %), bajo contenido de grasas (1.6-2.3 %), aunado a sus propiedades antioxidantes (Valdez *et al.*, 2009; Juárez *et al.*, 2011); los cuales resultan mejores comparados con los granos de maíz sin infección con tan solo 9% de contenido proteico y una mayor concentración de grasas del 5% (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 2016).

El aumento de la demanda de huitlacoche en el país y en el extranjero ha motivado el desarrollo de tecnologías científicas que conduzcan a la producción masiva de este hongo. Sin embargo, el huitlacoche para consumo y comercialización, en gran medida sigue

siendo recolectado de campos de maíz, donde se presenta la infección de forma fortuita sin ningún procedimiento técnico establecido, y la cual es menor al 5% del total de los cultivos de maíz (Ruiz, 2008). Por ello, es importante implementar y desarrollar técnicas de investigación factibles de realizar directamente en campo.

Este trabajo se realizó mediante un análisis de diferentes documentos científicos, enlistando los métodos utilizados desde las primeras técnicas en la inoculación de *U. maydis*, hasta los métodos reciente y con mejor infectividad en el maíz. Dividido en diferentes apartados dependiendo la técnica de inoculación y modo de obtención de teliosporas y basidiosporas hasta los métodos efectivos de inoculación:

1. Aislamiento y crecimiento en medios de cultivo.
  - Selección de cepas
  - Inoculación por espolvoreo de teliosporas.
  - Inoculación por inyección.
  - Inoculación en maíces criollos.
  - Inoculación en maíces híbridos.

Así mismo, se realizó una base de datos de los documentos publicados a partir del 2010.

Cuadro 1. Documentos revisados de 2010 al 2020

	<b>Autor- autores</b>	<b>Año</b>	<b>Nombre del artículo</b>
1	José Madrigal-Rodríguez, Clemente Villanueva- Verduzco, Jaime Sahagún- Castellanos, Marcelo Acosta Ramos, Lauro Martínez- Martínez, Teodoro Espinosa Solares.	2010	Ensayo de producción de Huitlacoche ( <i>Ustilago maydis</i> Cda.) hidropónico en invernadero.
2	Jiménez, O. M. K	2013	Proyecto de producción de inóculo de huitlacoche ( <i>Ustilago maydis</i> ) con fines comerciales.
3	Escalante Pérez, C.	2013	Estudios de la reacción del maíz al huitlacoche con fines de planificación de la cosecha.



4	Moncada, A. D., Cervantes, G. M. A.	2014	Aislar teliosporas de <i>U. maydis</i> para encontrar cepas patogénicas para producir huitlacoche.
5	Aguayo González, D. J.	2016	Producción de huitlacoche ( <i>Ustilago maydis</i> (DC) Corda) en el Estado de Aguascalientes.
6	González Trinidad, C.	2016	Producción de huitlacoche por inducción de la infección en maíz con <i>Ustilago maydis</i> bajo condiciones controladas.
7	Gámez-Domínguez, V.	2018	Evaluación de inóculos de <i>Ustilago maydis</i> en maíces de la región de Acatzingo, Puebla para la producción de huitlacoche
8	Escalante-Pérez Verduzco, C.	2020	Dinámica de la cosecha de huitlacoche ( <i>Ustilago maydis cda.</i> ) en nueve híbridos comerciales de maíz

---

### 1. Aislamiento y crecimiento en medios de cultivo

El aislamiento y manejo de cepas es de suma importancia en la inoculación de huitlacoche, ya que de esto dependerá la eficiencia en la infección del elote. El inoculante adecuado para el desarrollo de agallas debe cumplir con los requerimientos nutricionales y condiciones que el hongo necesita, estos medios requieren de azúcares necesarios en la nutrición de *U. maydis*. Los medios que cumplen con los requerimientos para el cultivo de son: papa dextrosa agar (PDA), extracto de malta y agar (EMA) (Sihuanca, 2011), caldo dextrosa y papa (PDB) y algunos medios no convencionales, como el uso de algunas harinas.

En las harinas se presentan almidones que son polisacáridos, el hongo libera enzimas degradadoras de estos, obteniendo subproductos como la glucosa que es consumida con mayor facilidad por el hongo (Leal, 1996). Por lo tanto, el medio donde se han inoculado teliosporas y basidiosporas es en papa dextrosa (Leal, 1996) y agar (Valdez, 2009), el primero es un medio líquido y el otro, un medio semisólido para el aislamiento de cepas. Los medios con harinas de maíz y de papa, son más económicos en comparación con otros medios de cultivo (Leyva, 2004).

Además de que cumplen con los requerimientos nutricionales necesarios para estos hongos.

En el aislamiento de cepas a través de teliosporas se obtienen de agallas secas, trituradas, tamizando con maya de 80 mm y germinadas en medio de cultivo papa dextrosa y agar (Leal, 1996). Las cepas, se obtienen a través de métodos fisicoquímico (filtración, centrifugación, gradiente de concentración con NaCl, y el uso de  $\text{CuSO}_4$  al 1% como bactericida), utilizando un medio líquido de extracto de maíz (González, 2016).

Otro método de obtención de cepas es a través de las agallas frescas, estas se desinfectan y siembran (teliosporas) en el medio de cultivo PDA con cloranfenicol, según la metodología de Ayala y Kiger (1984). Después de la obtención de la cepa se procede a obtener biomasa (basidiosporas) en un medio de mineral líquido, incubándose a 26° C bajo oscuridad durante cuatro días y ajustando los inóculos de basidiósporas a  $10^6/\text{ml}$  con agua destilada (Martínez *et al.*, 2000). En el trabajo de Leal (1998), concluye que es más conveniente usar inóculo de basidiosporas en lugar de teliosporas, ya que los resultados muestran mayor incidencia en la infección y formación de agallas con el uso de basidiosporas. También se puede obtener inóculos a partir de teliosporas de elotes con agallas cubiertas por las hojas, provenientes de agallas sanas, limpias, con peridio íntegro y sin coloraciones atípicas Escalante-Pérez *et al.* (2020); en este caso las teliosporas se trituran en una licuadora (vaso desinfectado) con agua destilada estéril; se filtra y se ajusta la suspensión a una densidad de  $10^6$  teliosporas/ ml. Se elimina una banda longitudinal de la hoja externa del elote inmaduro para limpiar los sitios de inoculación. Se aplica 1 ml del inóculo en el punto medio de cada uno de los tres tercios del elote inmaduro con jeringa hipodérmica estéril, cuando los elotes inmaduros tienen sus estigmas aproximadamente 5 cm fuera de las brácteas. En este trabajo se realizaron tres pasos consecutivos de inoculación, uno por día, obteniendo una producción de 4.5 t/ha, con agallas grandes 87 % de primera calidad (Martínez, 2000), quien obtuvo un rendimiento de 12 t/ha de huitlacoche a cielo abierto, y por Madrigal *et al.* (2010) que obtuvieron 29.8 t/ha en invernadero.

Por otro lado se pueden aislar basidiosporas en agar extracto de maíz, según González (2016), obteniendo un concentrado puro de teliosporas y un cultivo puro de basidiosporas, determinando que la fase

del hongo más eficaz para producir agallas en un estadios temprano del maíz fue la basidiospora, y que el medio de cultivo óptimo para obtener biomasa de basidiósporas fue en medio líquido con extracto de maíz diluido 1:2; además, se observó que al inocular por inyección  $2 \times 10^6$  basidiosporas/ml en diferentes etapas de desarrollo, resultó que el elote en la fase temprana es la más susceptible para inducir la formación de agallas. La aplicación de una sola dosis de inóculo o dos dosis de basidiosporas incrementan el porcentaje de formación de agallas (Leal,1996).

Los medios de cultivo con resultados favorables, son el medio líquido de papa dextrosa y elote en estadio temprano (antes de la polinización), utilizando una jeringa hipodérmica para introducir 3 ml de una suspensión de esporidias compatibles ( $1 \times 10^6$  ufc/ml), obteniendo porcentajes de infección en elote desde el 31 al 96%, y los porcentajes de cobertura del hongo en elote entre el 46 al 97%, con un valor promedio de 77% (Valdez *et al.*, 2009).

## **2. Selección de cepas**

En la inoculación de elotes con cepas seleccionadas de *U. maydis* se pueden mencionar que las cepas obtenidas de teliospóras son las que cubren totalmente de agallas de huitlacoche (Martínez *et al.*, 2000). Por otro lado, algunos autores han realizado entrecruzamientos de cepas para obtener una mejor infección en estos. Entre los trabajos de entrecruzamiento de cepas, está el de Cota (2003), donde se hace una evaluación de la cruce de cepas ITSONC2-ITSONC3 de *Ustilago maydis*. Estas cepas se inocularon en tubos con 10 ml de caldo de dextrosa de papa de la marca DIFCO, se incuban por 18-20 horas a una temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  en un baño con agitación a 200 revoluciones por minuto. Además, se pudo determinar que estas cepas presentaron mejores resultados en maíces criollos.

## **3. Inoculación por espolvoreo de teliosporas**

Uno de los primeros métodos de inoculación fue por espolvoreo de teliosporas sobre granos de maíz antes del sembrado, el cual da como resultados negativos para la inducción de agallas de *U. maydis* o bien,

espolvoreando teliosporas secas sobre las plantas (Gámez-Domínguez, 2018), obteniendo resultados, aunque los rendimientos suelen ser bajos.

#### 4. Inoculación por inyección

En este aspecto se han realizado diversos trabajos mediante la inoculación por inyección e induciendo agallas en los elotes variedad dulce, en las que se inyecta la suspensión de esporidias entre la hoja y el tallo en los nudos sextos, séptimo y octavo por debajo de la parte superior de la planta 0 a 8 días antes de la emergencia del elote. El desarrollo de las agallas fue más variable en los tallos y yemas axilares que en los elotes. Los periodos de maduración y aparición de agallas en híbridos de maíz dulce fueron a los 16, 17 y 19 días sobre suelo y bajo invernadero, respectivamente. Las agallas se presentan más grandes en las plantas inoculadas en el campo que en las inoculadas bajo invernadero. El tamaño de las agallas no varía en el tamaño inoculados en los tallos o yemas axilares y en plantas bajo invernadero o en campo.

Los híbridos inoculados en suelo bajo invernadero tuvieron entre un 27% y un 77% menos de elotes infectados, mientras que el 25% presentaron agallas en los elotes primarios, el 23% de los que no tenían agallas produjeron mazorcas normales, y el 32% de los que tenían agallas solo en las hojas, produjeron mazorcas.

La técnica de inyección es adecuada para estudios de interacciones huésped-patógeno entre maíz y *U. maydis* en el que, el desarrollo típico de agallas en plantas adultas es esencial, pero se requiere de más estudios antes de que pueda usarse para seleccionar genotipos de maíz y determinar la resistencia cuantitativa en la producción de estos (Thakur *et al.*, 1989).

La técnica de inyección por esporidias aumentó sustancialmente la incidencia de infección, pero aumentó la incidencia en tallo y hoja. Por lo tanto, el autor concluye que se necesitan investigaciones adicionales para determinar cuándo y cómo inocular *U. maydis* para inducir la formación de agallas en elote, para producir comercialmente huitlacoche y para detectar la resistencia a enfermedades (Pataky, 1991).

La inoculación por inyección en las hojas no leccionadas o parcialmente removidas resultó en poca o ninguna infección. El método de inyección en elote e inyección en punta resultó tener una incidencia hasta 97% (Pope, 1992). A partir de esto, se han tomado en cuenta los diferentes métodos de inoculación en diferentes etapas de desarrollo de la planta de maíz. Según Pope y Mc Carter (1992) inyectando 3 ml de una solución de esporidias a través del canal de los estilos, cuando el elote mide 10 cm, se obtiene un 97% de infección.

En la técnica de inyección la concentración de inoculante es importante, ya que cuando se aumenta la concentración de éste, aumenta la incidencia de infección, por ello, los autores recomiendan una concentración entre  $10^5$  y  $10^6$  de esporidias o 3 ml (Du Toit y Pataky, 1999; Gamez-Domínguez, 2018).

#### **5. Inoculación en maíces criollos**

Se ha evaluado el parasitismo en maíces criollos con cruza de cepas de *Ustilago maydis* ITSONC2-ITSONC3. Estas cepas se inocularon en tubos con 10 ml de caldo de dextrosa y papa de la marca DIFCO. La inoculación se realizó en el centro del elote, utilizando una jeringa hipodérmica de 20 ml, aplicando 1 ml a cada elote, con una concentración de  $2.0 \times 10^6$  células/ml. Los mejores resultados de infección en elote fue la cruce de cepas en basidiosporas (Cota, 2004). Por otro lado, se ha evaluado la susceptibilidad en 15 diferentes genotipos de maíz criollo. La metodología consistió en el desarrollo de las cepas compatibles de *U. maydis* en medio PDB; se inoculó el elote antes de la polinización con una jeringa hipodérmica con 3 ml de una suspensión de esporidias compatibles con concentración de  $10^6$  células/ml, el porcentaje de infección varió desde el 31 a 96 %, los porcentajes de cobertura del hongo sobre la mazorca oscilaron entre el 46 al 97 %, y con un valor promedio de 77 % (Valdez *et al.*, 2009)

#### **6. Inoculación en maíces híbridos**

Madrigal *et al.* (2010) realizaron ensayos bajo condiciones de invernadero para la producción de huitlacoche en hidropónia, evaluaron la producción del hongo en híbridos comerciales de maíz con cepas de teliosporas provenientes de los mismos tipos de híbridos de maíz;

germinaron las teliosporas en medio PDA para generar los inóculos de basidiosporas. El inóculo se preparó y ajustó en agua destilada estéril a una concentración de  $10^6$  esporidias/ml. La inoculación se realizó en etapa de jilote en tres puntos equidistantes a lo largo del mismo. Durante el periodo de infección, la temperatura se mantuvo entre 26 y 32 °C y la humedad relativa alrededor de 70 %. Al realizar un ajuste de la concentración a  $10^6$ /ml con agua destilada, encontrando mayor incidencia de infección en el híbrido comercial 30G40.

Por otro lado, Escalante (2013) evaluó la infectividad de las teliosporas y basidiosporas de *U. maydis* en diferentes híbridos comerciales de maíz, obteniendo las basidiosporas de un experimento anterior conservadas desde el 2001 en un cepario del laboratorio de fitotecnia de la Universidad Autónoma de Chapingo, estas se reactivaron en PDA; se inocularon nueve híbridos con una formulación de  $10^6$  esporidias/ml y también nueve híbridos con una formulación de  $10^6$  teliosporas/ml. Los híbridos se inocularon en el jilote cuando los estigmas presentaron una longitud expuesta de 5 cm, colocando 1 cm<sup>3</sup> de inóculo en tres sitios equidistantes del jilote en el centro de cada tercio de estos. En ambos ensayos, los mejores híbridos fueron Cronos y Dk-2042 presentando mejores rendimientos y calidad de agallas.

En 2016, Aguayo realizó la producción de *Ustilago maydis* de manera natural para comparar la producción artificial llevado a cabo por Martínez-Martínez *et al.* (2000), evaluando dos cruza de *U. maydis* del Estado de Aguascalientes y una cruza testigo de *U. maydis* del Estado de México contra seis variedades de semilla híbrida y criolla. La inoculación se llevó a cabo con una jeringa y se inyectaron 2 ml en una concentración de  $10^6$  por ml de inóculo, vía canal de los estilos que presentaban una longitud de 5 a 10 cm y antes de la polinización. Se determinó que los maíces híbridos presentan mayor formación de agallas en contraste con los maíces criollos. Sin embargo, dentro de los maíces híbridos el A7573 presentó mayor susceptibilidad de parasitismo.

Otros de los trabajos fue el de Escalante-Perez *et al.* (2020) donde se experimentó con agallas en nueve maíces híbridos para obtener inóculos a partir de teliosporas de mazorcas frescas. Obteniendo para los híbridos Cronos y Dk-2042, mayor producción de agallas (4.5 t/ha de las cuales 87 % fueron agallas grandes de primera calidad, mientras que en los híbridos

Gladiador, Gatillero y Caimán se obtuvo menor producción de agallas de las dos calidades. Los nueve híbridos presentaron rendimientos que oscilaron entre 1.30 a 4.54 t/ha, los cuales fueron bajos comparados con los reportados por Madrigal *et al.* (2010) que obtuvieron 29.8 t/ha bajo invernadero, y por Martínez (2000) quien obtuvo un rendimiento de huitlacoche por hectárea de 12 t/ha a cielo abierto.

## DISCUSIÓN

Las diferentes técnicas y procedimientos realizados por los autores tenían un objetivo en común: determinar una metodología eficiente para la producción del hongo *U. maydis*. Sin embargo, no en todos los ensayos se logró obtener resultados positivos, pero sirvieron como punto de partida para poder diseñar diferentes metodologías para la inoculación de *U. maydis*, y así obtener mejores resultados.

Si se toma como punto de comparación las dos técnicas de inoculación (espolvoreo e inyección), se puede decir, que los resultados de este fenómeno están relacionados con el ciclo de vida del hongo (Martínez, 2013), debido a que se emplean basidiosporas y que existen ventajas al hacer la aplicación en el hospedero, donde pueden germinar e iniciar la invasión de tejido inmediatamente, teniendo una mayor posibilidad de establecer la infección; en cambio, las teliosporas tienen que pasar por un proceso de germinación, meiosis y producción de basidiosporas, proceso que implica tiempo, y lo más importante, que se tengan las condiciones favorables para que esto suceda, mismas que pueden perderse fácilmente (Gámez-Domínguez, 2018).

Por otro lado, se determina que es más eficiente la infección en la fase de basidiosporas ya que son más fácil de obtener en cultivo semisólido y/o líquido, en comparación con la fase de teliosporas que necesitan un método fisicoquímico; además, es indispensable aplicar este método de separación para obtener las teliosporas puras y obtener basidiosporas, con ello lograr inóculos eficientes para la infección de *Ustilago maydis*.

Así mismo, se puede ver que el medio más eficiente es el agar extracto de papa (Gonzalez, 2016), esto se debe por los nutrientes presentes en el medio de cultivo proporcionando a la célula lo necesarios

para su desarrollo; además de una fuente de energía, que puede ser un compuesto orgánico e inorgánico (Madigan, 2003).

De igual forma, la producción de huitlacoche depende de varios factores como las condiciones ambientales, tipo de semilla y tipo de cultivo, etapa del desarrollo de la planta del maíz, la susceptibilidad genética de la semilla, y prácticas agronómicas principalmente (Pataký, 1991 y Pan *et al.*, 2008); además, de manera muy relevante, los tipos de patogenicidad en cada región, ya que existe una amplia diversidad genética en *U. maydis* (Jiménez, 2013; Calderón-Fernández, 2010).

Las semillas híbridas y criollas difieren en los resultados de producción natural, ya que la susceptibilidad de las semillas y la patogenicidad del hongo *U. maydis* están estrechamente relacionados para obtener una infección masiva en el cultivo del maíz (Aguayo, 2016).

## CONCLUSIONES

La alta demanda de este hongo mexicano (huitlacoche), ha impulsado a diversos investigadores a experimentar y desarrollar diferentes técnicas de obtención de basidiosporas y teliosporas en diferentes medios de cultivo para su posterior inoculación, con la finalidad de obtener mejores resultados a bajos costos de producción.

El medio de cultivo más usado en el crecimiento de *U. maydis* es el PDB (por sus siglas en inglés potato-dextrose-broth) ya que cuenta con los nutrientes requeridos por este hongo.

La técnica de inoculación que ha demostrado tener mejores resultados en el periodo de 2010-2020 en porcentaje de infección, rendimiento e incidencia de infección es la inoculación por inyección. Mientras que la técnica de aspersión de basidiosporas o teliosporas resulta ser una técnica poco eficiente, ya que se tiene un bajo porcentaje de rendimiento y de infección en las plantas de maíz.

Los maíces híbridos a los cuales se les ha inoculado *U. maydis* han mostrado mayor índice de infección y mayor rendimiento (kg/ha) en contraste con los maíces criollos. Por lo que, la búsqueda de nuevas técnicas de producción ha permitido el desarrollo y comprensión del proceso de infección de *U. maydis*, así como un mayor beneficio en la producción.



## REFERENCIAS

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. Quinta edición. Editorial Elsevier Academic Press.
- Aguayo González, D. J. (2016). Producción de huitlacoche (*Ustilago maydis* (DC) Corda) en el Estado de Aguascalientes.
- Aguirre-Acosta E., Ulloa M., Aguilar S., Cifuentes J., y Valenzuela R. (2014). Biodiversidad de hongos en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, S76-S81.
- Ayala, F. J., y Kiger, J. A. (1984). *Genética moderna* (No. 575.1 A9Y).
- Banuett, F. (1992). *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends in Genetics*, 8(5), 174-180. Anónimo, 1989. Caviar Azteca. Más 1:2.
- Banuett, F., y Herskowitz, I. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development*, 122(10), 2965-2976.
- Calderón-Fernández, M. L. (2010). Caracterización clásica y molecular del huitlacoche [*Ustilago maydis* DC (Corda)], hongo de importancia social y económica en la región central de México.
- Caltrider, P. G. y Gottlieb, D. (1965). Effect of sugar on germination and metabolism of *Ustilago maydis*. *Phytopathology* 56: 479-484.
- Camarena, G. (2001). Señales entre hongos patógenos y plantas hospederas resistentes. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 7(1), 15-19.
- Christensen, J. J. (1963). Corn Smut caused by *Ustilago maydis* Cda. The American Phytopathological Society. Department of Plant Pathology and Botany. Institute of Agriculture, University of Minnesota, St. Paul. 41 p.
- Cota, N. C. B. (2003). Evaluación de cepas locales de *Ustilago maydis* en maíz para la producción de huitlacoche en el valle del yaqui. (Tesis de licenciatura). Instituto Tecnológico de Sonora. México. pp. 5-18, 37-44.
- Escalante-Perez, C., Villanueva-Sánchez, E., Sahagún-Castellanos, J., Sánchez-Cabrera, I. y Villanueva-Verduzco, C. (2020). *Dinámica de la cosecha de huitlacoche (Ustilago maydis cda.) en nueve híbridos comerciales de maíz*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 23 (86), 1-10.

- Du Toit, L. J., y Pataky, J. K. (1999). Variation associated with silk channel inoculation for common smut of sweet corn. *Plant disease*, 83(8), 727-732.
- Escalante, P. C. (2013). *Estudios de la reacción del maíz al huitlacoche con fines de planificación de la cosecha*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Chapingo. México. pp. 3-12.
- Gámez-Domínguez, V. (2018). Evaluación de inóculos de *Ustilago maydis* en maíces de la región de Acatzingo, Puebla para la producción de huitlacoche (Tesis de licenciatura) Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).
- González T., C. (2016). Producción de huitlacoche por inducción de la infección en maíz con *Ustilago maydis* bajo condiciones controladas (Químico Bacteriólogo Parasitólogo). Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México.
- Herrera, T., y Ulloa, M. (1998). *El reino de los hongos: micología básica y aplicada* (No. 589.2 H565r). México, MX: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Islas L. (1994). Fitopatología. (1ª ed.). México. Editorial Limusa. pp. 61
- Jiménez, O. M. K. (2013). Proyecto de producción de inóculo de huitlacoche (*Ustilago maydis*) con fines comerciales. (Tesis de licenciatura). Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Agrícolas. México. pp. 3-20, 36-43
- Juárez, M., Ruiloba, S., Chávez, G., Hernández, C. y Villa, L., (2011). Huitlacoche causado por el hongo *Ustilago maydis* como un alimento funcional. *Revista Iberoamericana de Micología*. 28(2) 69-73.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma. L. J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wösten, H. A. B., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J., Feldbrügge, M., Basse, C. W., Steinberg, G., Ibeas, J. I., Holloman, W., Guzmán, P., Farman, M., Stajich, J. E., Sentandreu, R., González-Prieto, J. M., Kennell, J. C., Molina. L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greillinger, D., Münch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E. C. H., Cahill, M. J., Boyce, K. J., Klose, J., Klosterman, S. J., Deelstra, H. J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sánchez-Alonso, P., Schreier, P. H., Häuser-

- Han, I., Vaupel, M., Koopman, E., Friedrich, G., Voss, H., Schlüter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güldener, U., Münsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes H-W., Mauceli, E. W., DeCaprio, D., Wade, C. M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D. B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., Birren, B. W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444, 97-101
- Klosterman, S. J., Perlin, M. H., García-Pedrajas, M., Covert, S. F., y Gold, S. E. (2007). Genetics of morphogenesis and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Advances in genetics*, 57, 1-47
- Leal, C. M. A. (1996). *Evaluación de metodologías para la inducción artificial de huitlacoche*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. México. pp. 5-28, 35-56.
- Leyva, M. D. R. B. (2004). Utilización de dos medios de cultivo con formulación económica para la producción del inóculo de *Ustilago maydis*.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunalp, P. V., y Clark, D. P. (2003). *Brock. Biología de los microorganismos*, 12 ed. Editorial Pearson Prentice Hall Iberia, Madrid.
- Madrigal, R.J., Villanueva, V. C., Sahagún, C. J., Acosta, R. M., Martínez, M. L., Espinosa, S. T. (2010). Ensayo de producción de huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.) hidropónico en invernadero. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 16(3). Pp. 177-182.
- Martínez, F. A., Corrales, G.J.J., Espinoza, S. T., García, G. P. G., Villanueva, V. C. (2008). Cambios postcosecha del hongo comestible huitlacoche (*Ustilago maydis* (D. C.)). *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 14(3). 339-346.
- Martínez, L., Villanueva, C., & Sahagún, J. (2000). Susceptibilidad y resistencia del maíz al hongo comestible huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.) mejorando su virulencia. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 6(2), 241-248
- Martinez-Espinoza, A. D., Garcia-Pedrajas, M. D. y Gold, S. E. (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet. Biol.* 35, 1-20.

- Pan, J. J., Baumgarten, A. M., & May, G. (2008). Effects of host plant environment and *Ustilago maydis* infection on the fungal endophyte community of maize (*Zea mays*). *New Phytologist*, 178(1), 147-156.
- Pataky, JK (1991). Producción de cuiltlacoche [*Ustilago maydis* (DS) Corda] en maíz dulce. *HortScience*, 26 (11), 1374-1377.
- Piepenbring, M., López, F., y Cáceres, O. (2019). Colaboradores escondidos – La Importancia de los Hongos en los Ecosistemas Información para Educación Ambiental. *Puente Biológico*, 8(1), 57-91.
- Pope, D. D. (1992). Production of cuiltlacoche-the corn smut delicacy. Abstract. En: Proceeding of the VIIIth Biennial Workshop on the smut fungi. D. D. Pope (ed.) Department of Plant Pathology, University of Georgia, Athens, GA.
- Pope, D. D. y McCarter, S. M. (1992). Evaluation of inoculation methods for inducing common smut on corn ears. *Phytopathology* 82:950-955.
- Ruiz, H. J. (2008). *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico. *Revista Electrónica Nova Scientia*. 1(1). 118-135. México.
- Ruiz, R. L. (2013). Los basidiomicetos: una herramienta biotecnológica promisoriosa con impacto en la agricultura. *Fitosanidad*, 17(1) pp 49-55.
- Ruiz-Herrera, J., y Martínez-Espinoza, A. D. (1998). The fungus *Ustilago maydis*, from the Aztec cuisine to the research laboratory. *International Microbiology*, 1(2), 149-158.
- Sihuanca M. D., 2011. Desarrollo de un proceso biotecnológico para la producción de variedades especiales de hongos comestibles (*Pleurotus*, *Lentinula*, *Hypsizygus*), empleando bagazo de caña de azúcar y otros subproductos agrícolas y forestales como sustrato de cultivo. (Tesis doctoral) Colegio de Postgraduados “Campus Puebla”, México.
- Thakur, R. P., Leonard, K. J. y Pataky, J. K. (1989). Smut gall development in adult corn plants inoculated with *Ustilago maydis*. *Plant Disease* 73:921-925.
- Valdez, M. M., Valverde, M. E., Venegas, E. P. E., Paredes, L. O. (2009). *Procedimiento tecnológico para la producción masiva de huitlacoche*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. México.

Vanegas, P. E. (1995). Procedimientos tecnológicos para la producción de huitlacoche (*Ustilago maydis*) efecto de la cepa y materiales genéticos del maíz sobre la calidad. Tesis de maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Irapuato pp: 32-78.

## Capítulo 10

### **Jardín Botánico San Juan Bautista De La Salle: un espacio para la conservación y la educación ambiental en la zona norte de la Ciudad de México**

*Carlos Alberto Ruiz Jiménez<sup>1\*</sup> y Fabiola Dafne Saavedra Millán<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Puebla. carlos.ruizj@correo.buap.mx

<sup>2</sup>Jardín Botánico San Juan Bautista De La Salle, Escuela Cristóbal Colón, Gustavo A. Madero, Ciudad de México. dafnesaavedra@ecc.ed.u.mx

\*Autor de correspondencia: carlos.ruizj@correo.buap.mx

#### **RESUMEN**

La crisis ambiental que enfrentamos obliga a tomar decisiones que impacten positivamente en la conservación de la biodiversidad; los jardines botánicos (JB) son sitios de conservación *ex situ* para la conservación de las plantas, además son espacios donde se imparte educación ambiental y se desarrollan proyectos de investigación. La Escuela Cristóbal Colón es una escuela de nivel básico y medio superior, comprometida con el cuidado del planeta, considera de principal relevancia enseñar a los alumnos a mejorar su relación con el ambiente y la naturaleza. El objetivo del proyecto fue constituir un JB dentro de las instalaciones de la escuela para promover el conocimiento y cuidado de la biodiversidad mediante colecciones de plantas vivas que permitieran a nuestros alumnos y visitantes conocer la riqueza biológica de la región y del país, generando un compromiso con su conservación y uso adecuado, encaminándonos hacia el desarrollo sustentable. Se siguió el método establecido dentro del Plan de Manejo Tipo para Jardines Botánicos publicado por SEMARNAT para su registro como Unidad de Manejo

Ambiental para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA); se plantearon objetivos a corto, mediano y largo plazo, se registraron las colecciones de plantas del jardín y se solicitó el registro de la escuela como UMA de manejo intensivo con fines de educación ambiental y conservación de especies. El 17 de mayo de 2021, SEMARNAT otorga con vigencia indefinida el registro al Jardín Botánico San Juan Bautista De La Salle–ECC para realizar actividades de educación ambiental, reproducción, investigación, protección, restauración y aprovechamiento no extractivo. El 17 de marzo de 2022 se inauguró el JB, a la fecha se han realizado conferencias, recorridos y talleres para alumnos, docentes y personal de la escuela, así como para las autoridades de la Zona Escolar de la SEP a la que pertenece la misma.

**Palabras clave:** Jardín Botánico, Conservación, Educación Ambiental, Unidad de Manejo Ambiental para la Conservación de la Vida Silvestre, Zona Norte de la Ciudad de México

## **INTRODUCCIÓN**

Los problemas ambientales que enfrentamos en la actualidad se derivan del uso indiscriminado de los recursos naturales, la desvinculación del hombre con la naturaleza, la indiferencia de los gobernantes y la inactividad de la sociedad. La deforestación, la excesiva producción de gases de efecto invernadero, la contaminación de aire, suelo y agua, han acarreado problemas más severos tales como la desertificación y el calentamiento global, acelerando el cambio climático y con ello la inevitable pérdida de la biodiversidad.

México, como el resto de los países del mundo, ha tenido que afrontar esta problemática con la gran cantidad de variantes que implican el ser un territorio tan grande y diverso en cuanto a cultura y ecosistemas. Cada una de las entidades federativas enfrenta problemáticas particulares derivadas de su posición geográfica, el número de habitantes y la disposición de recursos a la que tienen acceso ya sea de manera natural o provista por los gobiernos.

La Ciudad de México es la capital del país, su superficie es de 1,494.3 km<sup>2</sup> y alberga a 9,209,944 que representa el 7.3% de la población del país, por tanto, esta ciudad presenta la densidad poblacional más alta

de México: 6,163.3 habitantes/km<sup>2</sup> (INEGI, 2022); dadas sus características, los principales problemas ambientales que enfrenta son el suministro de agua, la deforestación, la erosión del suelo y la contaminación del aire.

El agua es el principal recurso del que dependen todos los seres vivos y los seres humanos no somos la excepción; la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda una cantidad aproximada de entre 50 y 100 litros al día de agua para satisfacer las necesidades básicas de higiene y alimentación (Naciones Unidas, 2022); con base en lo anterior, se requieren 920,944,400 litros de agua para proveer de 100 litros del vital líquido a cada habitante de la ciudad al día. A pesar de que la ciudad está situada en un espacio geográfico en donde las lluvias son abundantes, no se cuenta con los mecanismos necesarios para la recarga de los mantos freáticos, tampoco se cosecha agua de lluvia ni se tienen sistemas de captación de agua, por si esto no fuera suficiente, las tuberías que transportan el agua potable presentan severos deterioros y la pérdida del líquido es frecuente debido a fugas en esta red; lo anterior hace que sea necesario traer agua de otras cuencas para surtir a la capital y esto ocasiona la escasez y con ello la restricción de este recurso en diversas alcaldías.

El segundo problema ambiental que enfrenta esta ciudad es la deforestación, históricamente el cambio de uso de suelo ha sido el principal factor que ha promovido la reducción de los bosques dentro de la ciudad, dejando relictos ubicados en la zona sur (bosques templados de pino, oyamel y encinos, matorrales xerófilos, pastizales naturales e inducidos) y en la zona norte (matorrales xerófilos y pastizales halófilos) de la ciudad que corresponden a las alcaldías de Cuajimalpa, Álvaro Obregón, Magdalena Contreras, Milpa Alta, Tláhuac, Tlalpan y Xochimilco y Gustavo A. Madero, respectivamente. (CORENA, s/f).

El tercer problema ambiental se relaciona de manera directa con el anterior y es la erosión del suelo. La pérdida de cobertura vegetal deja expuesto el recurso suelo mismo que se pierde por mecanismos tales como la lluvia y el viento en las zonas de la ciudad en donde aún se presentan áreas agrícolas de mayor dimensión, estos sitios se hallan en las alcaldías Milpa Alta, Tláhuac, Tlalpan y Xochimilco (CORENA, s/f; PAOT, 2014).



Finalmente, el cuarto problema que aqueja a esta ciudad es la contaminación del aire siendo su principal promotor el gran número de vehículos automotores que circulan en la misma, el parque vehicular que circula diariamente es de alrededor de 4.8 millones de vehículos que incluyen los matriculados en la ciudad de México y Área Metropolitana (Arana, 2022); además, se suman a esta cuenta aquellos cuyo destino no es esta ciudad pero transitan por ella (transporte de pasajeros y de carga); aunado a lo anterior, la industria es la actividad productiva que más contribuye a este rubro siendo la parte norte de la ciudad la más afectada.

La zona norte de la ciudad de México es una de las zonas que presenta mayores problemas ambientales, dadas sus características geográficas pues colinda de manera directa con los municipios de Coacalco, Ecatepec de Morelos, Naucalpan de Juárez, Tlalnepantla de Baz y Tultitlán que pertenecen al Estado de México, esta situación incrementa la circulación vehicular presentando los niveles más altos de partículas contaminantes en el aire; aunado a lo anterior sus condiciones ambientales, principalmente su relieve e hidrología determinan condiciones de menor humedad que las de las zonas sur y poniente de la ciudad, además la superficie territorial cubierta por vegetación es escasa.

Esta región de la Ciudad de México ha sido habitada desde el siglo XV, los pobladores utilizaron y agotaron los recursos disponibles convirtiendo los cerros en áreas desoladas y desnudas de vegetación; por esta razón en la zona se desarrolló vegetación secundaria que también estuvo sometida a un impacto sostenido.

Para 1870, Miguel Ángel de Quevedo implementó un programa de Repoblación Forestal exitoso que en un lapso de aproximadamente 67 años transformó el área en un verdadero oasis mismo que se decretó como Parque Nacional en el año de 1937, con la finalidad de que los habitantes de la capital de la República, turistas y visitantes “Disfruten de un espacio higiénico y de solaz que permita admirar las bellas perspectivas que se observan hacia la ciudad de México y hacia la planicie del antiguo lago de Texcoco”; sin embargo, nuevamente los pobladores cercanos a la zona sobreutilizaron los recursos fomentando el incremento de vegetación secundaria.

Esta zona ha sido objeto de innumerables reforestaciones que han dado como resultado una mezcla de especies de diversos orígenes y tipos

de vegetación que los pobladores continúan utilizando y eliminando; se han decretado dos Áreas Naturales Protegidas, la Sierra de Guadalupe y el Parque Nacional El Tepeyac, a pesar de ello, estos sitios siguen carentes de la vegetación que requieren para disminuir los niveles de contaminación del aire que tanto le aquejan y favorecerían la recarga de mantos freáticos evitando la escorrentía y con ello los deslaves tales como los ocurridos en la temporada de lluvias del año 2021.

Díaz (2012), refiere que la degradación del medio ambiente es una tendencia que tiene sus implicaciones en la sociedad, en los individuos y en la educación, por esa razón es que cobra una gran relevancia enfocar los esfuerzos en la educación si es que queremos frenar el deterioro de nuestro planeta que cada vez acarreará mayores problemas a nuestra sociedad.

En México, la Secretaría de Educación Pública (SEP), es la encargada de garantizar el derecho a la educación de todos los mexicanos que está plasmado en el artículo 3° de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos (1917), que a la letra dice: *“ Toda persona tiene derecho a la educación. El Estado -Federación, Estados, Ciudad de México y Municipios- impartirá y garantizará la educación inicial, preescolar, primaria, secundaria, media superior y superior... La educación inicial es un derecho de la niñez y será responsabilidad del Estado concientizar sobre su importancia. Corresponde al Estado la rectoría de la educación, la impartida por éste, además de obligatoria, será universal, inclusiva, pública, gratuita y laica”*. La Ley General de Educación (2021) es la encargada de regular al sistema educativo nacional y salvaguarda el cumplimiento del mandato constitucional establecido en su artículo 3°; además, esta ley tiene como uno de sus objetivos principales el propender a asegurar la calidad de la educación.

## **DESARROLLO**

La educación es el proceso de aprendizaje que dura toda la vida (desde la primera infancia hasta la muerte); por esta razón es que se requiere clasificar la variedad educativa. De acuerdo con el nivel de intencionalidad la educación se clasifica en formal, no formal e informal. La educación formal conlleva una intención deliberada y sistemática concretizada en un currículo oficial con estructuras verticales y

horizontales; en contraparte la educación no formal e informal es cualquier tipo de educación que se recibe por fuera del marco institucional (UPAV, s/f).

La educación no formal complementa la que los alumnos reciben en las aulas, posibilita que la educación llegue a todos los sectores de la población y los capacita con conocimientos que permitan mejorar su vida y la de sus comunidades, la Educación Ambiental (EA) es una de sus principales áreas de aplicación (UPAV, s/f); los sitios en los que se recibe este tipo de formación son los museos, zonas arqueológicas, jardines botánicos y demás sitios donde se provee de información mediante recorridos guiados, cursos y talleres.

En los Jardines Botánicos (JB) se imparten cursos, talleres, recorridos y conferencias para distintos sectores de la población, considerándolos como centros de educación no formal pues abarcan programas donde se proveen conocimientos generales y permiten acceder a los asistentes al aprendizaje organizado y ayudan a encontrar la manera de contribuir a sus comunidades (UNESCO, 2021); además los JB son sitios de conservación *ex situ* para la conservación de las plantas y son espacios donde se desarrollan proyectos de investigación.

Todo lo anterior pone de manifiesto dos problemas que requieren ser resueltos en conjunto si se pretende conservar los recursos naturales de los que dependemos todos los seres vivos: sensibilizar y educar a la población para que utilice de manera responsable los recursos naturales encaminándonos hacia la sustentabilidad; pese a que el objetivo es claro, los mecanismos para alcanzarlo se vuelven complejos pues radican en la suma de voluntades de la sociedad y el escaso interés de las instituciones encargadas de la educación. Ante esta perspectiva, la Educación Ambiental parece ser la respuesta que amalgama una solución posible.

En esta *suma de voluntades* se encuentra el proyecto que se está llevando a cabo en la Escuela Cristóbal Colón, es una escuela de nivel básico y medio superior ubicada en la zona norte de la ciudad de México, en la alcaldía Gustavo A. Madero; es una escuela lasallista que cayó en cuenta de la importancia de brindar a los alumnos una formación académica, humana y ambiental sólida que los comprometa y les proporcione herramientas para que participen de manera decidida en la

solución de los distintos problemas ambientales por los que nuestra sociedad atraviesa actualmente.

Para ello diseñaron un proyecto cuyo objetivo fue constituir un JB dentro de las instalaciones de la escuela para promover el conocimiento y cuidado de la biodiversidad mediante colecciones de plantas vivas que permitieran a los alumnos y visitantes conocer la riqueza biológica de la región y del país, generando un compromiso con su conservación y uso adecuado, encaminándolos hacia el desarrollo sustentable.

En el año de 2019 se planteó un proyecto en el cual se establecían cuatro áreas dentro del futuro jardín el *Arboretum*, los jardines de polinizadores, el huerto y el invernadero, de manera que las colecciones de plantas vivas, mostraran a los alumnos la riqueza vegetal de la cuenca del Valle de México y pudieran comprender procesos ecológicos al poder ver de cerca cómo es que se llevan a cabo; la intención del huerto y el invernadero era la de generar espacios experimentales para que los estudiantes participaran de manera activa en la propagación de las especies de plantas que se cultivarían en estos sitios.

Al tiempo se recibieron donaciones de plantas pertenecientes a la Cuenca del Valle de México, se realizaron adopciones de plantas en peligro de extinción propagadas en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, se comenzaron a sembrar los jardines de polinizadores y a construir el inmueble que albergaría el invernadero.

Para contar con el aval de SEMARNAT, se diseñó un plan de manejo fundamentado en el Plan de Manejo Tipo para Jardines Botánicos publicado por esta Secretaría, en éste se plantearon objetivos a corto, mediano y largo plazo, se registraron las colecciones de plantas del jardín y se solicitó el registro de la escuela como Unidad de Manejo Ambiental para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) de manejo intensivo con fines de educación ambiental y conservación de especies; el 17 de mayo de 2021, SEMARNAT otorga con vigencia indefinida el registro al *Jardín Botánico San Juan Bautista De La Salle - ECC* para realizar actividades de educación ambiental, reproducción, investigación, protección, restauración y aprovechamiento no extractivo.

Una vez otorgado el registro se comenzó con la construcción de la infraestructura del JB misma que incluye senderos, aula verde, bancales elevados para el huerto, áreas de trabajo y tienda del jardín así como la

instalación del sistema de riego que suministra agua tratada a toda el área de exhibición.

El 17 de marzo de 2022 se lleva a cabo la inauguración del Jardín Botánico San Juan Bautista De La Salle.

La colección principal del jardín está constituida por 76 especies de las cuales 36 ejemplares de plantas pertenecientes a 11 familias y 14 especies diferentes fueron donadas por parte del Dr. Carlos Alberto Ruiz Jiménez, profesor investigador de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; así mismo se recibió una donación de tres ejemplares de *Laelia autumnalis*, propagadas *in vitro* por el Dr. Eduardo Pérez García, Director del el Orquideario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México; además de once especies de plantas que se encuentran en alguna categoría de riesgo en la NOM-059-SEMARNAT-2010, que fueron adoptadas en el Jardín Botánico de la UNAM.

Se han llevado actividades muy importantes en lo que a Educación Ambiental se refiere, pues desde la inauguración del jardín se han impartido once conferencias por parte de investigadores de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza Campus III Tlaxcala de la Universidad Nacional Autónoma de México, del Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) Campus Tapachula, del Jardín Etnobotánico Francisco Peláez R. y del Jardín Botánico San Juan Bautista De La Salle; en estas conferencias se lograron reunir a un promedio de 1300 alumnos y docentes en cada conferencia pertenecientes a las secciones Secundaria y Preparatoria de la Escuela Cristóbal Colón.

También se impartieron talleres relacionados con el conocimiento, cuidado y uso sustentable de la biodiversidad a los alumnos de las secciones Preescolar, Primaria, Secundaria y Preparatoria de la Escuela Cristóbal Colón y se recibieron visitantes de la Escuela Primaria Profesor Laureano Jiménez y Coria.

## **CONCLUSIÓN**

Si bien este proyecto se encuentra en una etapa inicial, se ha logrado conseguir avances muy importantes en un lapso breve de tiempo, en este ejercicio se ha podido determinar que los alumnos y docentes se interesan

por los temas ambientales y se identifican cambios significativos en los comportamientos cotidianos dentro de la escuela.

Es por demás promisorio vislumbrar que el cumplimiento de los objetivos planteados para la UMA son altamente probables de conseguir pues, si bien queda mucho camino por recorrer se continua trabajando en talleres y cursos que promuevan el conocimiento y cuidado de la biodiversidad así como el consumo responsable; no se deja de lado el objetivo de hacer crecer la colección de plantas vivas y a la par ir desarrollando las colecciones accesorias a ésta (Herbario y Banco de Semillas); además seguir colaborando en proyectos de investigación con profesores de distintas Universidades.

## REFERENCIAS

- Arana, L. (2022). Analizan actualizar el Hoy No Circula. *El Universal*, Metrópoli. Recuperado de <https://www.eluniversal.com.mx/metropoli/cuanto-vehiculos-circulan-al-dia-en-la-valle-mexico>
- Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos (1917). Diario Oficial de la Federación, viernes 28 de 05 de 2021.
- Comisión de Recursos Naturales. (s/f). El suelo de Conservación del Distrito Federal. Procuraduría Ambiental y del Ordenamiento Territorial [Archivo PDF]. <https://paot.org.mx/centro/programas/suelo-corena.pdf>
- Díaz, G. (2012). El Cambio Climático. *Ciencia y Sociedad*, XXXVII (2):227-240 Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/870/87024179004.pdf>
- Instituto Nacional de Estadística, Geográfica e Informática. (2022). Información por Entidad. Ciudad de México. Recuperado de <https://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/df/default.aspx?tema=me&e=09>
- Naciones Unidas. (2022). Desafíos Globales. Agua. Recuperado de <https://www.un.org/es/global-issues/water>
- Ley General de educación (2021). Diario Oficial de la Federación, martes 20 de abril de 2021.
- Procuraduría Ambiental y del Ordenamiento Territorial. (2014). Áreas verdes urbanas del Distrito Federal: elementos básicos. México, 134 p.

- Recuperado de  
[http://centro.paot.org.mx/documentos/paot/estudios/Areas\\_Verdes.pdf](http://centro.paot.org.mx/documentos/paot/estudios/Areas_Verdes.pdf)
- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, 30 de diciembre, México, D.F.
- Universidad Popular Autónoma de Veracruz. (s/f). Pedagogía. Bachillerato Virtual. [Archivo PDF].  
[http://www.universidadupav.edu.mx/documentos/BachilleratoVirtual/Contenidos\\_PE\\_UPAV/6Trimestre/PEDA%20I/Unidad1/tema3.pdf](http://www.universidadupav.edu.mx/documentos/BachilleratoVirtual/Contenidos_PE_UPAV/6Trimestre/PEDA%20I/Unidad1/tema3.pdf)
- UNESCO (2021). Las TIC en la educación. Recuperado de  
<https://es.unesco.org/themes/tic-educacion>