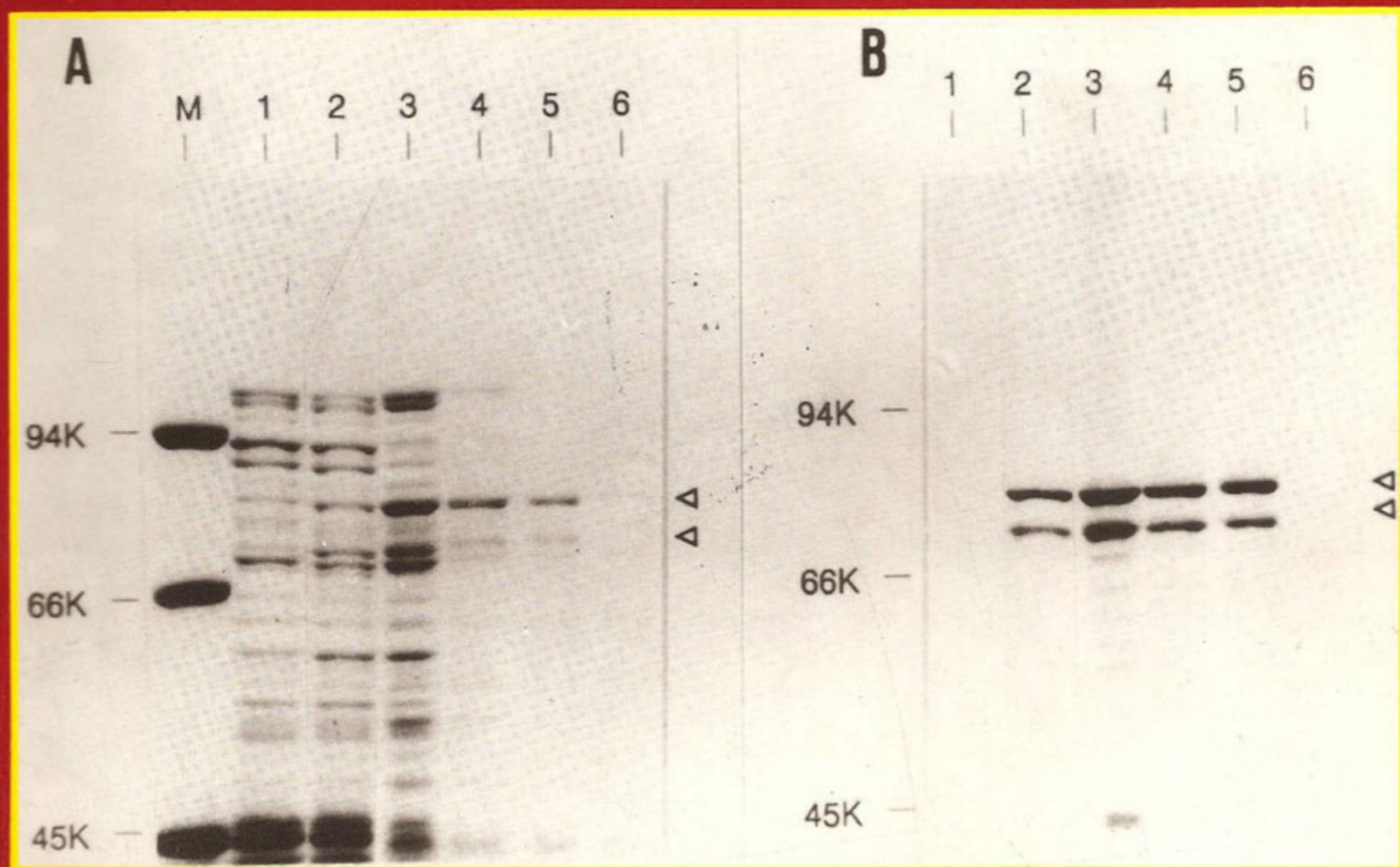


# ACTA CIENTIFICA DE LA SOCIEDAD VENEZOLANA DE BIOANALISTAS ESPECIALISTAS

VOL 4 N° 1 1995  
ISSN - 1315 - 1746  
PP - 92 - 0487



## CONTENIDO

Editorial ..... 3

### Trabajos Originales

Expresión como proteínas de fusión de las subunidades PB1 y PB2 de la Polimerasa del virus de la influenza  
*M. Ochoa; S. de Luna; M. E. Pacheco; A. Nieto; J. Sanz; J. A. Melero; J. Ortín; A. Portela*..... 8

Efectos de la Dehidroepiandrosterona sobre el desarrollo embrionario en ratas  
*Gabriela Arata de Bellabarba; Nelia González de Moreno* ..... 19

Recuperación espermática: efectos de la composición del medio  
*Zambrano, Midalia Josefina; Villasmil Bastidas, Saúl Antonio* ..... 28

### Trabajos de Revisión

El legado de Pasteur, y los inicios de la medicina científica en la Venezuela de finales del siglo XIX  
*Vidal Rodríguez Lemoine* ..... 47

Laboratorio y Diabetes Mellitus  
*Mariela Paoli de Valeri; Gabriela Arata de Bellabarba* ..... 56

### Otros

XVII Encuentro Anual de la Asociación de Editores de Revistas Biomédicas Venezolanas ..... 68

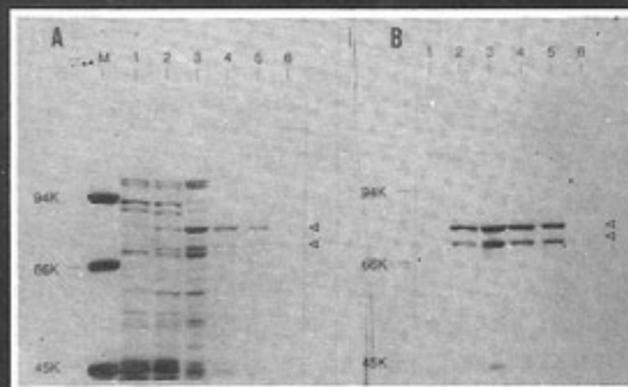
Normas para publicación de Trabajos en el Acta Científica de la S.V.B.E ..... 72

## PORTADA

Caracterización antigénica de la subunidad PB2 de la polimerasa del virus de la gripe utilizando anticuerpos monoclonales.

Tomado de: M. Ochoa; J. Bárcena; S. de la Luna; J.A. Melero; A.R. Douglas; A. Nieto; J. Ortín; J.J. Skehel; A. Portela.

Epitope Mapping of Cross-Reactive Monoclonal Antibodies Specific for the Influenza A Virus PA and PB2 polypeptides Virus Research 37 (1995) 305-31.



# Editorial

---

**A**

las puertas del siglo XXI, el vertiginoso avance de la ciencia, el desarrollo de la tecnología y la creciente competencia en el campo laboral representan un reto para el Bioanalista de un país, que como Venezuela, está obligado a buscar su camino para ingresar al grupo de las naciones más avanzadas. Por esto, la decisión tomada en la pasada Convención extraordinaria celebrada en Caracas los días 30 y 31 de agosto de 1996, de iniciar un vasto plan de trabajo destinado a mejorar la calidad del Bioanálisis en todas las áreas que le competen y de igual manera, fijar objetivos y políticas en los procesos que se están llevando a cabo en Venezuela como son: descentralización y privatización, significa un gran paso de avance para nuestra Profesión. En este orden de ideas el slogan utilizado a principios del presente año con motivo de la visita del Sumo Pontífice de la Iglesia Católica: «Despierta y reacciona», tiene que hacerse una realidad para los Bioanalistas de vanguardia que desean lo mejor para su Profesión. Las condiciones con las cuales se cuenta para lograr avances no son las mejores desde el punto de vista financiero pero el conocimiento, el ingenio y la voluntad por lograr lo óptimo deberían impulsar al venezolano con visión de futuro y en nuestro caso al Bioanalista que sin lugar a dudas tiene un compromiso con las generaciones futuras. Las IX Jornadas de la S.V.B.E. y el VIII Congreso Venezolano de Bioanálisis a celebrarse en marzo del próximo año conjuntamente con el XIII Congreso Latinoamericano de Bioquímica Clínica son oportunidades para actualizar conocimientos e incrementar la participación en los procesos evolutivos que se inician. La incorporación de todos es necesaria para alcanzar la excelencia que se desea para el Bioanálisis, pero sin lugar a dudas los Bioanalistas Especialistas no sólo deben tomar parte en la planificación proyectada sino convertirse en verdaderos agentes de cambio de su realidad. El proceso renovador en Bioanálisis está en marcha y es responsabilidad de todos aportar el esfuerzo correspondiente para alcanzar el éxito. La consigna es: acción.

*Josefina Guariguata  
Presidenta de la S.V.B.E.*

# EXPRESIÓN COMO PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE LAS SUBUNIDADES PB1 Y PB2 DE LA POLIMERASA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA

M. Ochoa (1), S. de Luna (2), M. E. Pacheco (3), A. Nieto (2), J. Sanz (2), J. A. Melero (4), J. Ortín (2), A. Portela (4). (1) Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Ciudad Universitaria. Caracas 1040, Venezuela. FAX N° (2) 6053327. (2) Centro Nacional de Biotecnología (CSCI). Universidad Autónoma. Cantoblanco 28049. Madrid, España. (3) Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Ciudad Universitaria. Caracas 1040, Venezuela. (4) Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Biología Celular y Retrovirus. Majadahonda 28220. Madrid, España.

## RESUMEN

Los cADNs de los genes que codifican las proteínas PB1 y PB2 de la ARN polimerasa del virus de la influenza, se clonaron en fase en un sitio distal del ATG que codifica la proteína 10 del bacteriófago T7, en el vector de expresión pAR3040, bajo el control de un promotor de la ARN polimerasa de T7. Los plásmidos recombinantes se introdujeron en la cepa bacteriana *E. coli* BL21 (DE3)pLysS, que contiene en su genoma el gen de la ARN polimerasa del fago T7, bajo el control de un promotor (*lac uv5*) inducible por IPTG. La inducción de la ARN polimerasa del fago T7 en las células hospederas, resultó en la expresión de las proteínas PB1 y PB2 en forma de proteínas de fusión. Las proteínas expresadas se acumularon en grandes cantidades en el interior de las células bacterianas y fueron recuperadas de los lisados en forma de precipitados insolubles.

Palabras claves: expresión de proteínas/vector de expresión/T7 ARN polimerasa/ADN recombinante.

## ABSTRACT

cDNAs genes coding for influenza virus RNA polymerase PB1 proteins, were fused in frame after the 11th codon of the T7 bacteriophage major capsid protein, on the overexpression vector pAR3040, under the control of T7 RNA polymerase promoter. Recombinant plasmids were transferred to *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS which has in its genome phage T7 RNA polymerase gene, under *lac uv5* promoter, inducible by IPTG. Induction of the T7 RNA polymerase in host cells resulted in extensive overproduction of PB1 and PB2 polypeptides as fusion proteins. The overproduced material was recovered from cell lysates as insoluble precipitates.

(protein overproduction/expression vector/T7 RNA polymerase/recombinant DNA).

\*Autor al que se dirigirán correspondencia y solicitud de separatas.

## INTRODUCCIÓN

El genoma de los virus de la influenza de los tipos A y B está formado por ocho segmentos genéticos de ARN, de banda simple y de polaridad negativa, que codifican al menos diez proteínas virales<sup>(1)</sup>. Los procesos de replicación y transcripción de estos virus comprenden una serie de reacciones enzimáticas complejas, que son catalizadas por la ARN polimerasa asociada al virión<sup>(2,3,4,5)</sup>. Esta polimerasa está constituida por tres subunidades polipeptídicas denominadas PB1 (86Kd), PB2 (82Kd) y PA (84Kd), o complejo de proteínas P, las cuales son codificadas por los segmentos genéticos de mayor tamaño del virus y presentan como característica particular, la de asociarse entre sí formando complejos<sup>(6,7,8,9)</sup>. En la partícula viral las tres proteínas P y la nucleoproteína (NP) se asocian al ARN viral formando complejos de ribonucleoproteínas (RNPs), los cuales constituyen los moldes funcionales para la replicación y transcripción del genoma viral<sup>(5)</sup>.

Aunque durante la década pasada se ha acumulado una información extensiva mediante análisis bioquímicos y genéticos respecto a las funciones de algunas de las subunidades que constituyen el complejo de proteínas P<sup>(3,10,11,12)</sup>, poco se sabe acerca de las relaciones estructura-función de cada una de estas proteínas dentro del complejo de transcripción y replicación. En este sentido, los antisueros y anticuerpos monoclonales han demostrado ser reactivos de gran utilidad, en general, para el estudio de las proteínas, ya que con ellos se han podido derivar por ejemplo, características antigénicas y funcionales particulares. Sin embargo, una de las principales limitaciones encontradas al intentar preparar antisueros y anticuerpos monoclonales contra cada una de las subunidades de la polimerasa viral, ha sido el hecho de que dichas proteínas se encuentran en muy pequeña cantidad tanto en viriones como en células infectadas<sup>(13,14)</sup>.

A objeto de obtener suficiente cantidad de estas proteínas, para su posterior utilización como inmu-

nógenos, hemos construido plásmidos recombinantes que permitan la expresión en forma de proteínas de fusión, de las subunidades PB1 y PB2 de la polimerasa del virus de la influenza. El sistema elegido para la expresión, basado en la ARN polimerasa del bacteriófago T7<sup>(15)</sup>, nos había permitido previamente la expresión adecuada y su uso posterior como inmunógenos, de la proteína PA completa y de un fragmento de 402 aminoácidos del extremo amino-terminal de la proteína PB2<sup>(16,17)</sup>.

## MÉTODOS

**Plásmidos y cepas bacterianas.** La fuente de los genes de PB1 y PB2 fueron los plásmidos pARB1-12(18) y pUK-PB2 (cedido por J. Sanz) respectivamente. Estos plásmidos se obtuvieron en la cepa bacteriana *E. coli* DH5 y contienen una copia de cADN del gen completo que codifica por las proteínas PB1 (segmento 2) y PB2 (segmento 1), de la cepa A/Victoria/3/75.

El recombinante pARB1-B1, se obtuvo por modificación por PCR del plásmido PARB1-12 y posterior subclonaje del producto de la amplificación en el sitio de restricción Bam HI del vector de expresión PAR-3040<sup>(19)</sup>. La estructura del plásmido pAR3040 se muestra en la figura 1 y, como puede observarse, presenta los siguientes elementos de control: a) El promotor  $\phi$ 10 que precede al gen 10 del bacteriófago T7 (I). b) La secuencia Shine-Delgarno que precede en 8 nucleótidos al codón de iniciación del gen 10 del bacteriófago T7 (SD). Los 15 primeros codones del gen 10, que codifican por la proteína mayoritaria de la cápsida del bacteriófago y que incluye una diana de restricción para la enzima Bam HI (III). d) El terminador de la transcripción T $\phi$  (\*), que actúa como un eficiente terminador de la transcripción para la T7 ARN polimerasa y e) El gen que confiere resistencia a la ampicilina (ApR). El recombinante pARB2-A1 se obtuvo por subclonaje del gen de PB2 en el sitio de restricción Bam HI del mismo vector.

La expresión de los genes de PB1 y PB2 se realizó en un sistema basado en la ARN polimerasa del bacteriófago T7, utilizando los recombinantes derivados del plásmido pAR3040, en la cepa bacteriana BL21(DES)pLysS<sup>(20)</sup>. Esta cepa bacteriana está específicamente optimizada para la expresión de proteínas tóxicas.

**Manipulación de ácidos nucleicos.** El método utilizado para la preparación del ADN plasmídico fue el de la lisis alcalina<sup>(21)</sup>. Las digestiones con endonucleasas de restricción, tratamientos con ADN polimerasa I fragmento Klenow, ADN ligasa del bacteriófago T4 y fosfatasa alcalina, así como la desproteinización y concentración de ácidos nucleicos, se hicieron si-

guiendo los protocolos estándares descritos anteriormente<sup>(22)</sup>. Para la elución de los fragmentos de ADN de geles de agarosa de bajo punto de fusión se utilizó el estuche comercial GENE CLEAN II (Biö 101).

i) **Secuenciación de ADN.** Para la secuenciación del ADN plasmídico se siguió el método de los terminadores específicos de cadena<sup>(23)</sup>. Para ello, se empleó el estuche comercial SEQUENASE VERSIÓN 2.0 (USB), que utiliza [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]ATP y la enzima ADN polimerasa del bacteriófago T7 (Sequenasa), siguiendo las instrucciones del suministrador. Los productos de reacción se separaron en geles desnaturizantes de acrilamida-bisacrilamida del 6%, conteniendo urea 7M y se expusieron para autorradigrafía.

ii) **Amplificación in vitro del gen de PB1 a partir del plásmido pARB1-12.** Para la amplificación in vitro de las secuencias codificantes del gen de PB1 se utilizaron los oligonucleótidos 5' PB1ATGL (5' GGAATTCGGATCCAATGGATGTCAATCCGACTT TA 3') y 3' PB1UAAL (5'GCTACGGGATCCATATGG ACAAGCTTAAATTCATTA3'), los cuales incluyen una diana de restricción para la enzima Bam HI (subrayado). Se tomaron 10 - 20 ngr del ADN plasmídico pARB1-12 linearizado y se amplificaron en un volumen de 100  $\mu$ l conteniendo Tris-HCl (pH 8) 10 mM, 50  $\mu$ M de cada uno de los deoxinucleótidos trifosfato, 0,25 mM de cada uno de los oligonucleótidos correspondientes, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y 1.5 Unidades de Taq ADN polimerasa. Las reacciones se sometieron a 20 ciclos de desnaturización del ADN a 93°C durante 45 segundos, hibridación con el iniciador a 37°C durante 1 minuto y polimerización a 72°C durante 20 minutos. Se empleó un ciclo extra de polimerización durante 20 minutos. Para la amplificación se utilizó un termociclador automatizado (DNA THERMAL CYCLER de Perkin Elmer Cetus). El producto amplificado se concentró utilizando filtros Centricon 30, se extrajo con fenol, se recogió por precipitación con etanol y se analizó por electroforesis en un gel de agarosa del 0,7%.

**Transformación de bacterias e identificación y caracterización de los plásmidos obtenidos.** Para la preparación de bacterias DH5 competentes y su posterior transformación con plásmidos, se utilizó el método del Cloruro de Rubidio<sup>(24)</sup>. La preparación de las bacterias BL21 (DE3)pLysS competentes se hizo siguiendo protocolo descrito previamente<sup>(20)</sup>.

i) **Transformación de ADN de colonias bacterianas.** El método seguido se basó en el procedimiento descrito por Grunstein y Hogness en 1975<sup>(25)</sup>. Brevemente, se colocó un filtro de nitrocelulosa encima de la placa de cultivo y éste se levantó después de aproximadamente 5 minutos. Las bacterias

adheridas al filtro se lisaron por tratamiento con NaOH 0,5 M durante 10 minutos, se neutralizaron con Tris-HCl (pH 7,5) durante 10 minutos y se incubaron con una solución Tris-HCl pH (7,5) - NaCl 2M. El ADN se fijó al filtro por calentamiento a 80°C durante 2 horas en una estufa de vacío.

ii) **Identificación de bacterias que portan el plásmido recombinante de interés.** La identificación se llevó a cabo por hibridación con sondas específicas por cada gen, marcadas radiactivamente. Los oligonucleótidos sintéticos se marcaron con [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP y polinucleótido kinasa del bacteriófago T4. La mezcla de reacción conteniendo Tris-HCl pH (7,5) -  $\text{MgCl}_2$  10mM - DTT 5 mM, 40 mCi de [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP, 30 ngr del oligonucleótido y 1 unidad de polinucleótido kinasa, se incubó a 37°C durante 45 minutos. La reacción se detuvo por calentamiento a 60°C durante 5 minutos.

Los filtros que contenían el ADN de las bacterias, se incubaron en una solución de hibridación (5x Denhardt, 6x SSC - SDS 0,2% y 1 mgr de esperma de salmón) a 42°C durante 2 horas. Los filtros se hibridaron en la misma solución con la sonda marcada a 42°C durante 16 horas. El material no unido se eliminó por 3 lavados sucesivos con la solución de hibridación y los filtros se secaron y expusieron para autorradiografía.

**Expresión y análisis de las proteínas recombinantes.** Los experimentos se realizaron según protocolo descrito anteriormente<sup>(20)</sup>. Las bacterias se cultivaron en medio M9 con 50  $\mu\text{gr/ml}$  de ampicilina y 25  $\mu\text{gr/ml}$  de cloranfenicol a 37°C en agitación, hasta obtener una  $\text{DO}_{600} = 0,6$ . En este punto, se indujo la expresión de la proteína recombinante por la adición de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) 4 mM al medio de cultivo. Tras incubarse 30 minutos a 37°C, se añadieron 100 mgr de rifampicina al cultivo, a objeto de inactivar la ARN polimerasa bacteriana, continuándose la incubación durante 90 minutos más. Finalizado el período de la inducción, las células se centrifugaron a 7.000 rpm en centrífuga Sorvall/rotor GSA durante 10 minutos a 4°C, resuspendiéndose el sedimento en el tampón A [Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM - NaCl 100 mM - EDTA 1 mM y 0,5% de glicerol] (1% del volumen original del cultivo inducido). El lisado celular se congeló y descongeló por tres veces consecutivas y se centrifugó a 12.000 rpm en centrífuga Sorvall/rotor SS-34, durante 10 minutos a 4°C. El sedimento insoluble se resuspendió en un volumen de tampón B (tampón A con 0,1% de deoxicolato sódico) y se trató con DNasa I (10  $\mu\text{gr/ul}$ ) en presencia de  $\text{MgCl}_2$  10mM, durante 30 minutos a 4°C. Se repitieron dos pasos de centrifugación adicionales, en iguales condiciones a las anteriores, pero resuspendiéndose esta vez el sedimento insoluble en un volumen de

tampón D (tampón B con NaCl 0,5M). Las proteínas presentes en los lavados y en el sedimento insolubles se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida 7,5% - SDS 0,1%<sup>(26)</sup> y se visualizaron por tinción con azul de Coomassie.

Las proteínas inducidas también se analizaron por marcaje con [ $^{35}\text{S}$ ]-metionina. En este caso, después de los 90 minutos de incubación con IPTG, se tomaron 25  $\mu\text{l}$  del cultivo inducido que se incubaron durante 5 minutos a 37°C con 5  $\mu\text{Ci}$  de [ $^{35}\text{S}$ ]-metionina. A continuación, las bacterias se sedimentaron y se fraccionaron sus componentes tal y como se describe en el párrafo anterior.

## RESULTADOS

**Clonaje de los genes que codifican por las proteínas PB1 y PB2 en el plásmido pAR3040.** Se pretendía subclonar los genes que codifican por las proteínas PB1 y PB2 del virus de la influenza A/Victoria/3/75 en el sitio de restricción Bam HI del vector pAR3040. Este sitio coincide con la secuencia que codifica por los aminoácidos 13 y 14 del gen 10 del bacteriófago T7<sup>(19)</sup>.

La estrategia seguida para la construcción del recombinante de PB1 (figura 2) consistió en amplificar mediante la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) la secuencia codificante del gen de PB1, a partir del plásmido pARB1-12<sup>(18)</sup>. En la reacción de amplificación se utilizaron oligonucleótidos sintéticos que contenían, además de las secuencias específicas para el gen, dianas para la enzima de restricción Bam HI, que no digiere internamente en la secuencia de nucleótidos del gen de PB1. Tras la reacción de PCR, el ADN amplificado se trató con ADN polimerasa fragmento Klenow, se dirigió con la enzima de restricción Bam HI y posteriormente, se aisló de una agarosa de bajo punto de fusión del 0,7%. El producto aislado se ligó con T4 ADN ligasa al vector pAR3040, previamente digerido con la enzima Bam HI y desfosforilado por tratamiento con fosfatasa alcalina.

Para la obtención del recombinante de PB2 (figura 3), se utilizó el plásmido PUKPB2, en el cual la secuencia codificante de PB2 se encontraba flanqueada por dianas de restricción para la enzima Bam HI, que eran únicas en el plásmido. El ADN plasmídico se dirigió con Bam HI, se aisló la banda correspondiente al gen, a partir de una agarosa de bajo punto de fusión y se clonó en el sitio Bam HI del vector pAR3040. Con ambos plásmidos se transformaron bacterias *E. coli* DH5 competentes y la identificación de las bacterias recombinantes se llevó a cabo por hibridación *in situ*, con sondas radiactivas específicas para cada gen<sup>(25)</sup>. Los plásmidos recombinantes que contenían el gen viral se anali-

zaron por restricción, a fin de determinar la orientación del inserto en el vector (resultados no mostrados). Los recombinantes obtenidos; pARB1-B1 y pARB2-A1, los cuales contenían los genes correspondientes a las proteínas PB1 y PB2 respectivamente, orientados correctamente en el vector (figura 4A), se analizaron por secuencia de la región próxima al promotor de la T7 ARN polimerasa<sup>(23)</sup> (figura 4B). Los ATG iniciadores que codifican por las proteínas PB1 y PB2, quedaron clonados en fase a continuación del onceavo codón que codifica por la proteína del gen 10 del bacteriófago T7.

Con esta estrategia se esperaba que los polipéptidos traducidos a partir de los ARNs, contuvieran una corta secuencia extra de aminoácidos en el extremo amino-terminal, correspondiente a la proteína 10 del bacteriófago T7.

**Análisis de la expresión de las proteínas PB1 y PB2 en *E. coli*.** A objeto de obtener suficiente cantidad de los polipéptidos PB1 y PB2 para su empleo posterior, se expresaron los genes clonados, en un sistema de expresión procariótico basado en la ARN polimerasa del bacteriófago T7<sup>(15)</sup>. En este sistema la fuente de la ARN polimerasa es una copia única del gen 1 de dicho bacteriófago, clonada bajo el control del promotor *lac uv5* (inducible por IPTG y que está integrada en el cromosoma de la cepa bacteriana BL21 (DE3)pLysS). Esta cepa contiene además, un plásmido que confiere resistencia a cloranfenicol y que expresa en forma constitutiva la lisozima del fago T7. Esta enzima actúa como un inhibidor de la T7 ARN polimerasa bacteriana<sup>(27)</sup>, lo cual permite que, en condiciones de no inducción, la cepa bacteriana exhiba niveles basales bajos de la enzima, favoreciendo la tolerancia a genes clonados cuyos productos resultasen tóxicos. Los plásmidos pARB1-B1 y pARB2-A1, se introdujeron en bacteria *E. coli* BL21(DE3)pLysS competentes. Los cultivos bacterianos transformados se crecieron e incubaron con IPTG, que induce la síntesis de la T7 ARN polimerasa, ésta a su vez reconoce su promotor y genera los transcritos de los genes a expresar.

El análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida, teñido con azul de Coomassie, del extracto bacteriano transformado con el recombinante pARB2-A1, inducido con IPTG, reveló la presencia de dos bandas, que no estaban presentes en el cultivo control transformado con el plásmido pAR3040 (indicadas con una flecha; comparar canales 1 y 2 de la figura 5A). La banda de mayor tamaño posee la movilidad esperada para la proteína PB2 completa, mientras que la de menor tamaño puede corresponder a un producto de iniciación interno o a un producto de degradación de la proteína. El análisis de los lisados de estas bacterias, por centrifugación y lavado de los correspondientes sedimentos con

diferentes tampones, reveló que tales bandas siempre aparecían en el sedimento correspondiente (canales 3 y 4) y que no se solubilizaban por el tratamiento con una solución que contiene 0,1% de deoxicolato sódico y NaCl 0,5 M (canal 5). En el caso de las bacterias transformadas con el recombinante pARB1-B1 (figura 6A), no se observó en extractos totales del cultivo inducido, la aparición de una nueva banda (comparar canales 1 y 2). Sin embargo, sí se observó que en estas bacterias y no en las bacterias transformadas con el plásmido pAR3040, se acumulaba un polipéptido insoluble que tenía la movilidad electroforética esperada para la proteína PB1 completa.

**Análisis de las proteínas inducidas por marcaje con [<sup>35</sup>S]-metionina.** Para confirmar que los polipéptidos sintetizados correspondían a un producto de la transcripción de los genes de PB1 y PB2 por la ARN polimerasa del fago T7, se analizaron los productos sintetizados por las bacterias durante un pulso con [<sup>35</sup>S]-metionina. Los cultivos bacterianos se indujeron con IPTG, 30 minutos después de la inducción se añadió rifampicina y se continuó la incubación. A los 90 minutos se dio un pulso con [<sup>35</sup>S]-metionina durante 5 minutos. La rifampicina es una droga que inhibe la ARN polimerasa bacteriana, pero no la ARN polimerasa del fago T7, con lo cual, se esperaba que a los 90 minutos después de la adición de esta droga no quedarán ARNs bacterianos y, por tanto, la marca que se observara vendría de los transcritos generados por la ARN polimerasa de T7. Como se observa en las figuras 5B y 6B, no se marcó ninguna proteína en bacterias transformadas con el plásmido pAR3040, mientras que sí se observaron bandas en los cultivos transformados con los plásmidos recombinantes. Dichas bandas, además, se correspondían por tamaño con las que se habían observado en los sedimentos insolubles de los geles teñidos con azul de Coomassie. Por tanto, se concluye que las bandas observadas se derivaban de los transcritos de los genes clonados. En el caso del recombinante pARB2-A1, también se observó la aparición de una banda de menor tamaño (señalada con una flecha), que quizás pueda corresponder a un producto de iniciación interno o a un producto de degradación de la proteína. Esta proteína también asumió el mismo comportamiento que la proteína de mayor tamaño durante el proceso de lisados y centrifugaciones en los diferentes tampones utilizados.

## DISCUSIÓN

Una de las principales limitaciones encontradas en el estudio de las características y funciones de las subunidades de la polimerasa viral, ha sido la de

no disponer de suficiente cantidad de cada una de estas proteínas. Es por este motivo, que en este estudio se aborda la expresión de las subunidades PB1 y PB2. El sistema seleccionado fue el sistema de expresión procariótico descrito por Studier y Moffat en 1986<sup>(15)</sup>, el cual se basa en el uso de la ARN polimerasa del bacteriófago T7. Con este sistema se ha descrito la expresión de diversas proteínas, tanto de origen procariótico como eucariótico<sup>(16, 28, 29, 30, 31)</sup>.

Estudios previos, utilizando plásmidos recombinantes derivados del pAR3040, que contenían clonados los genes completos que codifican por las proteínas PB1 y PB2, de la cepa A/Victoria/3/75, habían demostrado no ser efectivos en la producción de proteínas recombinantes en este mismo sistema<sup>(18)</sup>. Este hallazgo sugiere que, cuando se intenta expresar proteínas, a pesar de que el gen se haya clonado bajo un promotor fuerte, este hecho no necesariamente garantiza su expresión. La ausencia de expresión cuando se utilizaron estos plásmidos podía deberse a varios factores, entre los cuales podemos mencionar: a) Una baja eficiencia durante el paso de inicio de la traducción<sup>(32)</sup>, b) Una elevada degradación de la proteína en *E. coli*, o c) Un efecto tóxico de la proteína, lo que podría resultar en una pérdida del plásmido por el cultivo bacteriano, originando una reducción de la cantidad de proteína recombinante producida.

Como una alternativa para resolver el problema de la ausencia de expresión con estos plásmidos, se decidió preparar recombinantes que expresaran las proteínas virales PB1 y PB2 como proteínas de fusión. De esta forma, se construyeron dos plásmidos recombinantes en los cuales, la secuencia de nucleótidos que codifica por la correspondiente proteína viral (PB1 o PB2), se fusionó en fase a un sitio distal del codón iniciador del gen 10 del bacteriófago T7, presente en el vector de clonaje (y que corresponde al primer codón transcrito por la T7 ARN polimerasa). Así las señales de inicio de la traducción que se utilizarían, serían las correspondientes al gen 10, las cuales están adaptadas para una eficiente traducción y además, poseen el espaciamento

adecuado entre la secuencia Shine-Dalgarno y el ATG iniciador de la proteína.

La expresión de proteínas heterólogas, como proteínas de fusión, ha demostrado poseer un número de ventajas en relación a la expresión de proteínas completas que carecen de secuencias extras de aminoácidos<sup>(37)</sup>, entre las cuales podemos mencionar: a) Un aumento en la acumulación de la secuencia proteica deseada, lo que a su vez se traduce en un aumento de la disponibilidad de proteína a purificar y b) Un facilitamiento en la detección y purificación de la proteína en cuestión. Otra ventaja adicional de esta estrategia, podría ser que las proteínas de fusión producidas fueran más estables por contener una secuencia de aminoácidos de una proteína que se expresa en forma natural en *E. coli* y también, podrían resultar menos tóxicas por contener secuencias de aminoácidos foráneos.

Los plásmidos diseñados (pARB1-B1 y pARB2-A1) resultaron adecuados para la expresión de las proteínas respectivas. Tal como se muestra en el apartado de análisis y expresión de las proteínas PB1 y PB2 en *E. coli*, las bacterias inducidas transformadas con dichos plásmidos, expresaron proteínas con el peso molecular esperado y estas proteínas se acumularon en grandes cantidades en las bacterias (3 µgr/µl de cultivo).

Un hallazgo significativo que también ha sido demostrado previamente para una variedad de productos proteicos de diverso origen<sup>(34, 35, 36, 37)</sup>, resultó ser, el que en ambos casos, las proteínas que se acumulaban en *E. coli*, lo hacían en forma de un precipitado insoluble dentro de la célula bacteriana, como puede observarse en las figuras 5 y 6 partes A y B. Este comportamiento repercute probablemente en el elevado rendimiento obtenido, ya que se ha descrito que las proteasas intracelulares no degradan las proteínas que se encuentran formando agregados<sup>(38)</sup>.

En conclusión, las proteínas recombinantes preparadas ofrecen una fuente adecuada de reactivos que pueden ser de utilidad como inmunógenos, en la preparación de antisueros y anticuerpos monoclonales.

Figura 1. Estructura del plásmido pAR3040<sup>(19)</sup> (ver detalles en texto).

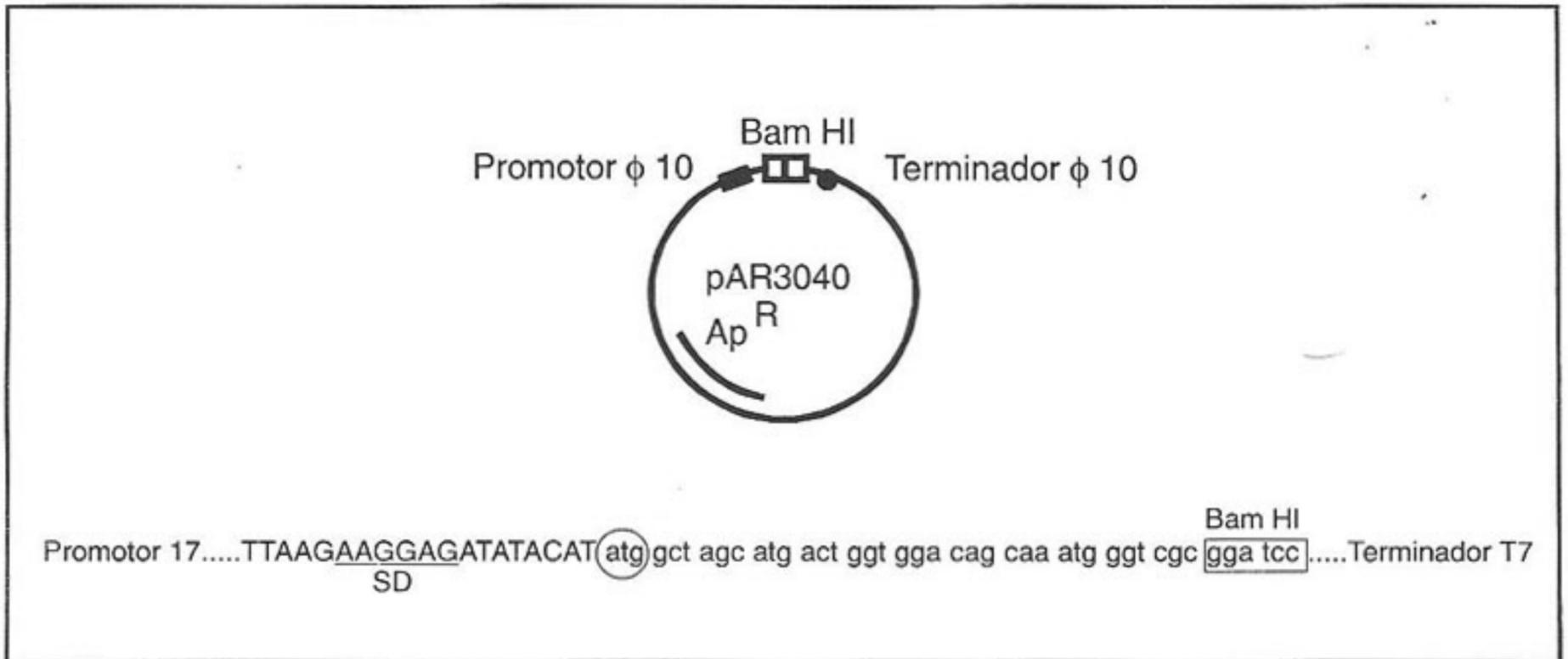


Figura 2. Esquema de construcción del plásmido pARB1-B1. Los símbolos son los mismos indicados en la figura 1. Los detalles se describen en MATERIALES Y MÉTODOS.

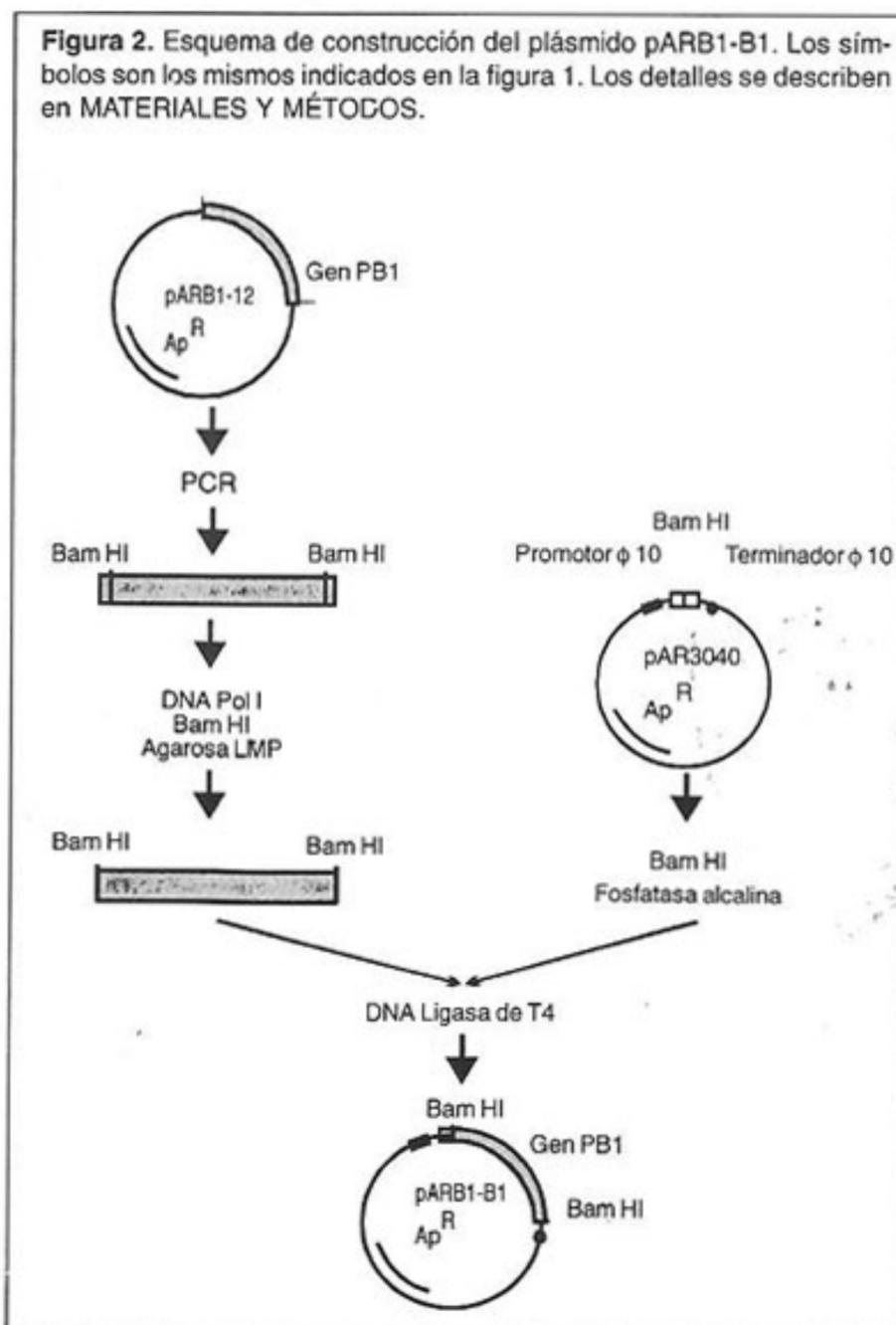
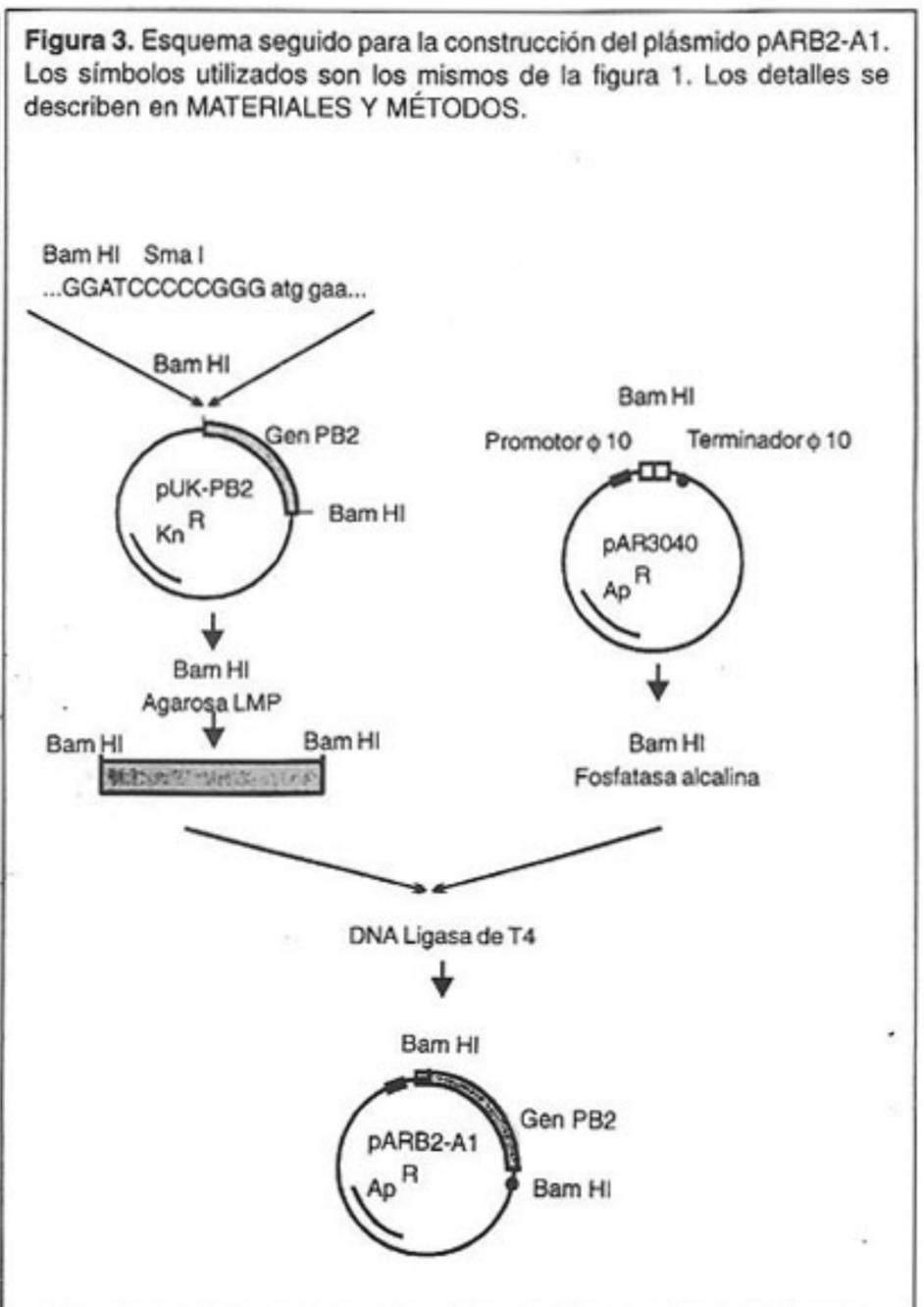
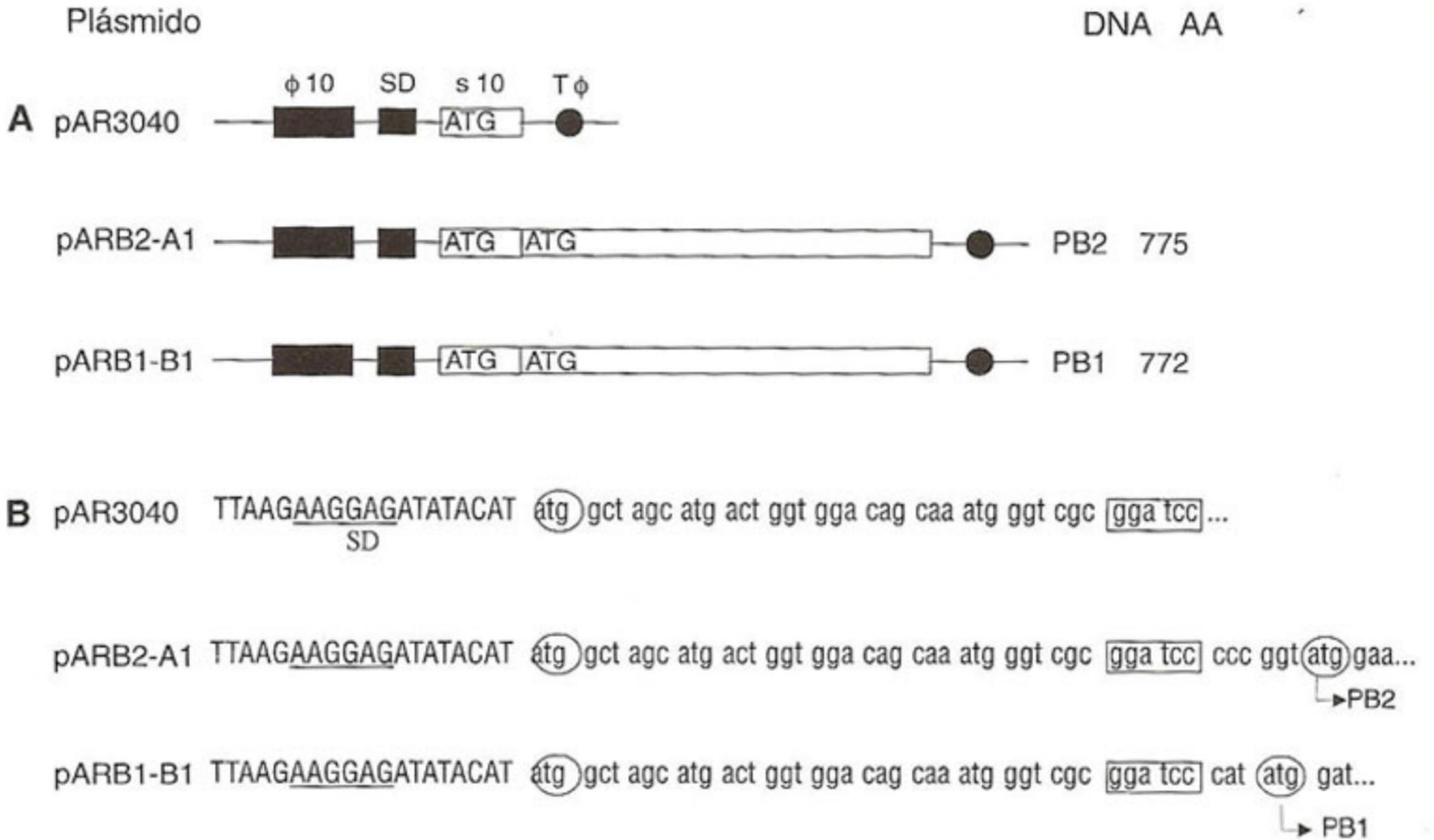


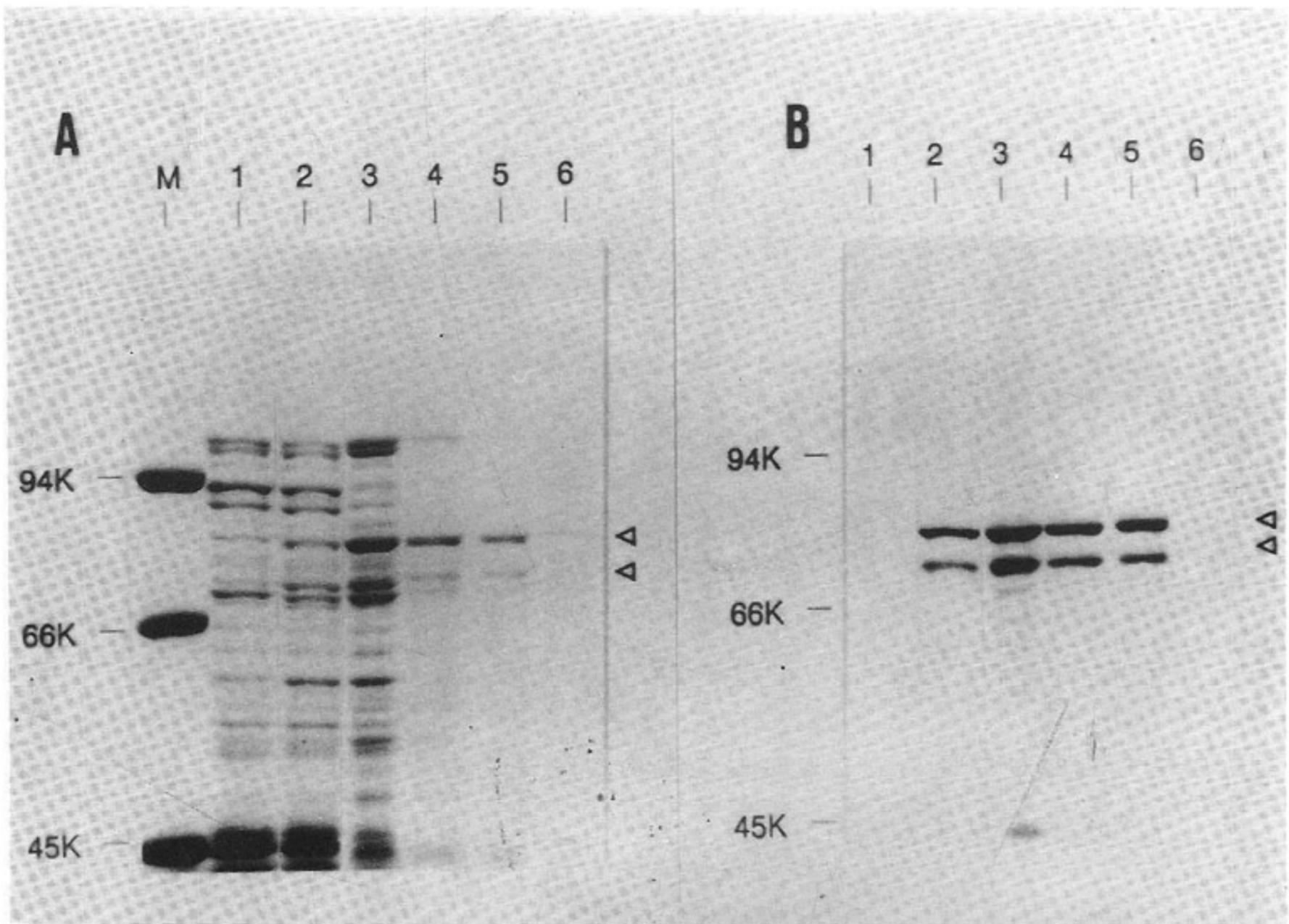
Figura 3. Esquema seguido para la construcción del plásmido pARB2-A1. Los símbolos utilizados son los mismos de la figura 1. Los detalles se describen en MATERIALES Y MÉTODOS.



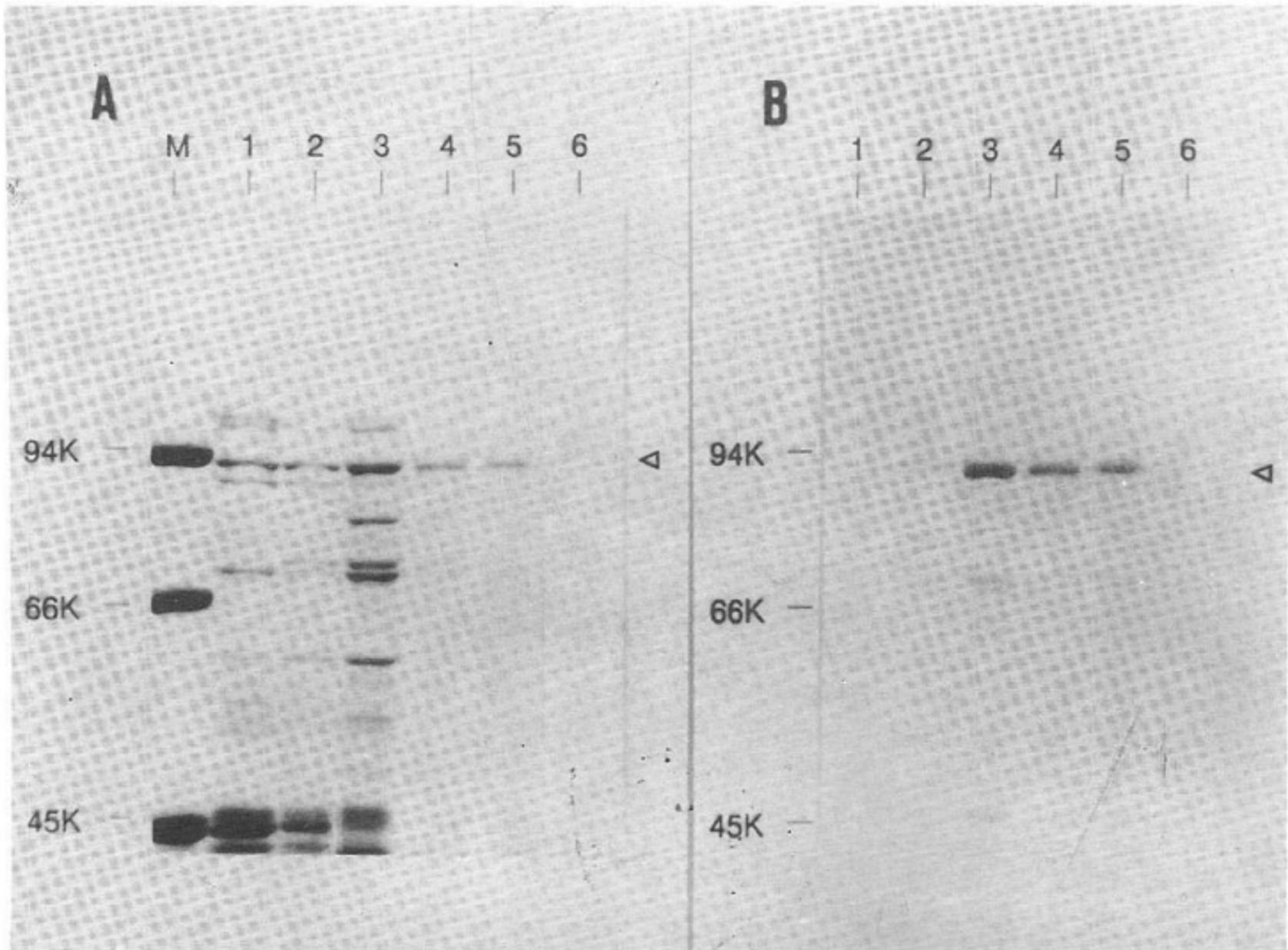
**Figura 4.** A) Esquema de la estructura de los plásmidos pARB2-A1 y pARB1-B1. Se indica la longitud en aminoácidos predichos para las dos proteínas de fusión (AA). B) Secuencia de nucleótidos en el sitio de iniciación de la proteína en los plásmidos pAR3040, pARB2-A1 y pARB1-B1. Los codones de iniciación de la proteína mayoritaria de la cápsida del bacteriófago T7 (gen 10) y las proteínas PB2 y PB1 están encerradas en un círculo. Se indican en letras las secuencias que codifican por la proteína 10 del bacteriófago T7. La secuencia Shine-Dalgarno se encuentra subrayada (SD).



**Figura 5.** Análisis de las proteínas inducidas en bacterias *E. coli* BL21 (DE3)pLysS que transportan el plásmido pARB2-A1 por electroforesis en gel de poliacrilamida - SDS. A) Gel teñido con azul de Coomassie. B) Autorradiografía del mismo gel (ver detalles de marcaje con [<sup>35</sup>S]-metionina y procesamiento en METODOS). Extractos celulares totales preparados a partir de cultivos bacterianos inducidos con IPTG durante 2 horas, portando el plásmido pAR3040 (canal 1) o el plásmido recombinante pARB2-A1 (canal 2). Las proteínas de cultivos que portan el plásmido pARB2-A1 que permanecieron insolubles después de los lavados en tampón NaCl 0,1 M (canal 3), NaCl 0,1 M más 0,1% de deoxicolato sódico (canal 4) y NaCl 0,5 M más 0,5% de deoxicolato sódico (canal 5). Sedimento del cultivo portando el plásmido pAR3040 tras el lavado en tampón NaCl 0,5 M y 0,5% de deoxicolato sódico (canal 6). Marcadores de peso molecular (canal M). Se indican la posición de los marcadores de peso molecular y se indican también con flechas las proteínas inducidas.



**Figura 6.** Análisis de las proteínas inducidas en bacterias *E. coli* BL21(DE3)pLysS que transportan el plásmido pARB1-B1 por electroforesis en gel de poliacrilamida - SDS. A) Gel teñido con azul de Coomasie. B) Autorradiografía del mismo gel (ver detalles de marcaje con [<sup>35</sup>S]-metionina y procesamiento en METODOS). Extractos celulares totales preparados a partir de los cultivos bacterianos inducidos con IPTG durante 2 horas, portando el plásmido pAR3040 (canal 1) o el plásmido recombinante pARB1-B1 (canal 2). Proteínas del cultivo que portan el plásmido pARB1-B1 que permanecieron insolubles después de los lavados en tampón NaCl 0,1 M (canal 3), NaCl 0,1 M más 0,1% de deoxicolato sódico (canal 4) y NaCl 0,5 M más 0,1% de deoxicolato sódico. Sedimento del cultivo portando el plásmido PAR3040 tras el lavado en tampón NaCl 0,5 M más 0,1% de deoxicolato sódico (canal 6). Marcadores de peso molecular (canal M). Se indican la posición de los marcadores de peso molecular y se indica también con una flecha la proteína inducida.



## REFERENCIAS

1. Lamb, R.A. (1989) Genes and proteins of influenza viruses. En: R. M. Krug (Ed). The Influenza Viruses. Plenum, New York, pg. 1-87.
2. Horisberger, M. A. (1982) Identification of a catalytic activity of the large basic P polypeptide of influenza virus. *Virology* **120**: 279-286.
3. Braam, J., Ulmanen, Y., Drug, R.M. (1983) Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell* **34**: 609-618.
4. Huang, T.S., Palese, P., Krystal, M. (1990) Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J. Virology* **64**: 5669-5673.
5. Krug, R.M. (1983) Transcription and replication of influenza virus. En: P. Palese and D.W. Kingsbury (Eds). *Genetics of Influenza Viruses*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio, pg. 71-89.
6. Akkina, R.K, Chambers, T.M., Londo, D.J., Nayak, D.P. (1987) Intracellular localization of the viral polymerase proteins in cells infected with influenza virus and cells expressing PB1 protein from cloned cDNA. *J. Virology* **61**: 2217-2224.
7. Detjen, B.M., St Angelo, C., Katze, M.G., Krug, R.M. (1987) Influenza polymerase P proteins not associated with viral nucleocapsides in the infected cell are in form of a complex. *J. Virology*: **61**: 16-22.
8. St. Angelo, C., Smith, G., Summers, M.D., Krug R.M. (1987) Two of the three influenza viral polymerase proteins expressed by using baculovirus vectors form a complex in insect cells. *J. Virology* **61**: 361-365.
9. Digard, P., Blok, V.C., Inglis, S.C. (1989) Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology* **171**: 162-169.
10. Plotch, S., Bouloy, M., Ulmanen, Y., Krug, R.M. (1981) A unique cap (m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* **23**: 847-858.
11. Ulmanen, Y., Broni, B.A., Krug, R.M. (1981) The role of two of the influenza virus core proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 7355-7359.
12. Romanos, M.A., Hay, A.J. (1984) Identification of the influenza virus transcriptase by affinity-labeling with pyridoxal 5'-phosphate. *Virology* **132**: 110-117.
13. Inglis, S.C., Carrol, R.A., Lamb, R.A., Mahy, B.W.J. (1976) Polypeptides specified by the influenza virus genome Y. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus. *Virology* **74**: 489-503.
14. Kawakami, K., Ishihama, A., Amaguchi, M. (1981) RNA polymerase of influenza virus I. Comparison of the virion-associated RNA polymerase activity of various strains of influenza virus, *J. Biochemistry* **89**: 1751-1757.
15. Studier, F.W., Moffat, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
16. Bárcena, J., Ochoa, M., de la Luna, S., Melero, J.A., Nieto, A., Ortín, J., Portela A. (1994) Monoclonal antibodies against influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *J. Virology* **68**: 6900-6909.
17. Ochoa, M., Bárcena, J., de la Luna, S., Melero, J.A. Douglas, A.R., Nieto, A., Ortín, J., Skehel, J.J., Portela, A. (1995) Epitope mapping of cross-reactive monoclonal antibodies specific for the influenza A virus PA and PB2 polypeptides. *Virus Research* 305-315.
18. de la Luna S. (1989) Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, España.
19. Rosenber, A.H., Lade, B.N., Chol, D., Lin, S.W., Dunn, J.J., Studier, F.W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA Polymerase. *Gene* **56**: 125-135.
20. Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 ARN polymerase to direct the expression of cloned genes. En: D.V. Goeddel (Ed) *Gene Expression Technology. Methods in Enzimology* **185**: 60-89
21. Birboim, H.L., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids. Res.* **7**: 1513-1523.
22. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd Ed. Cold Spring Harbor, New York.
23. Sanger, F., Micklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467.
24. Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. En: *DNA Cloning A Practical Approach Vol I*. D.M. Glover (Ed) IRC Press Limited, Oxford pg. 109-135.
25. Grunstein, M., Hogness, D.S. (1975) Colony hybridization: A method for isolation of cloned DNAs that contain specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*: **72** 3961-3965.
26. Studier, F.W. (1973) Analysis of bacteriophage T7 earlyRNAs and proteins on slab gels *J. Mol. Biol.* **79**: 237-248.

27. Moffat, B.A., Studier, F.W. (1987) T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* **49**: 221-227.
28. Morris, C.E., Klement, J.F., McAllister, W.T. (1986) Cloning and expression of the bacteriophage T3 RNA polymerase gene. *Gene* **41**: 193-200.
29. Carbonetti, N.H., Sparling, F. (1987) Molecular cloning and characterization of the structural gene for protein I, mayor outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 9084-9088.
30. McKiney, J.D., Lee, J., O'Neill, R.E., Goldfarb, A. (1987) Overexpression and purification of a biologically active rifampicin-resistant  $\beta$  subunit of *E. coli* RNA polymerase. *Gene* **58**: 13-18.
31. Smith, M.A., Napier, J.A., Stymne, S., Tathan, A.S., Shewry, P.R., Stobarts, A.K. (1994) Expression of a biologically active plant cytochrome b5 in *Escherichia coli*. *Bioch J.* **303**: 73-79.
32. Kozak, M. (1983) Comparision of initiation of protein synthesis in prokaryotes, eukaryotes and organelles. *Microbiol. Rev.* **47**: 145.
33. Hockney, R.C. (1994) Recent developments in heterologoud protein production in *Escherichia coli*. *TIBTECH.* **12**: 456-463.
34. Ivanoff, L.A., Towatari, T., Ray, J., Korant, B.D. (1986) Expression and site-specific mutagenesis of the poliovirus 3C protease in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 5392-5396.
35. Sekine, S., Muzukami, T., Nishi, T., Kuwana, Y., Saito, A., Sato, M., Itho, S., Kawauchi, H. (1985) Cloning and expresión of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 4306-4310.
36. Zurawski, S., Mosmann, T.R., Benedick, M., Zurawski, G. (1986) Alterations in the amino-terminal third of mouse interleukin 2: Effects on biological activity and immunoreactivity. *J. Immunology* **137**: 3354-3360.
37. Goliger, J.A., Roberts, J.W. (1987) Bacteriophage 82 gene Q and Q protein. Sequence, overproduction and activity as transcription anti-terminator in vitro. *J. Biological Chem.*: **262** 11721-11725.
38. Kane, J.F., Hartley, D.L. (1988) Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *TIBTECH.* **6**: 95-100.

# EFECTOS DE LA DEHIDROEPIANDROSTERONA SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN RATAS

Gabriela Arata de Bellabarba, Nelia González de Moreno

Laboratorio de Neuroendocrinología de la Reproducción - Departamento de Fisiopatología  
Facultad de Medicina - Universidad de Los Andes  
Mérida - Venezuela

## RESUMEN

La dehidroepiandrosterona (DHEA) y su ester sulfato (DHEA-S) son los esteroides más abundantes producidos por la corteza suprarrenal. A pesar de que sus funciones específicas no han sido claramente establecidas, se sabe que un aumento en los niveles séricos de la DHEA-S puede ir asociado con anovulación o con muerte fetal. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la administración de la DHEA en dosis de 20 mg/Kg de peso (experimentales) o el vehículo (controles) durante los días 5º al 8º (implantación), 9º al 14º (embriogénesis) y 15º al 19º (crecimiento fetal). El día 20º, los úteros se extrajeron, se fijaron, se pesaron y luego, se disecaron los fetos, se pesaron y se estudiaron macroscópicamente. Cuando la DHEA se administró durante los períodos de implantación y embriogénesis no se obtuvieron fetos a término. Durante la última etapa (días 15º al 19º), la DHEA produjo una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) en el peso fetal (1,84 gr/feto vs 2,11 gr/feto control), sin alteración de su viabilidad. Los resultados demuestran que la administración de la DHEA durante las etapas de implantación y embriogénesis inhibe total y selectivamente el desarrollo del embrión, mientras que, durante la etapa de crecimiento fetal, la DHEA reduce el peso de los fetos sin alterar su anatomía macroscópica externa.

### Palabras claves:

Dehidroepiandrosterona, Desarrollo embrionario, Mecanismos.

## ABSTRACT

The dehydroepiandrosterone (DHEA) and its ester sulfate (DHEA-S) are the most abundant steroids produced by the adrenal cortex. Spite that its specific functions have not been clearly established, it's known that an increase in its serum value may be associated with anovulation and fetal death. The objective of this work was to study the effect of the administration of DHEA in doses of 20 mg/Kg of weight (experimental) or the vehicle (controls) during the days 5<sup>th</sup> to 8<sup>th</sup> (implantation), 9<sup>th</sup> to 14<sup>th</sup> (embryogenesis) and 15<sup>th</sup> to 19<sup>th</sup> (fetal growth). On the 20<sup>th</sup> day, the uteri were removed, fixed, weighed and then, the fetuses were dissected, weighed and studied macroscopically. When DHEA was administered during the periods of implantation and embryogenesis no fetuses were obtained at term. During the last stage (days 15<sup>th</sup> to 19<sup>th</sup>), DHEA produced a significant decrease ( $p < 0,001$ ) in fetal weight (1,84 gr/fetus vs 2,11 gr/fetus control), without alteration of its viability. The results demonstrate that the administration of DHEA during the stages of implantation and embryogenesis totally and selectively inhibits embryo development, while its administration on a later period (fetal growth) only affects fetal weight.

injected with 20 mg/Kg of DHEA (experimental) or vehicle (control) on days 5th to 19th (fetal growth). On the 20th day animals were killed, the uterus dissected and the number, development and fetal weight registered. When DHEA was administered during the 5th to 14th day there were not well established fetuses. Administration of DHEA, during the 15th to 19th day diminished significantly ( $p < 0,001$ ) embryo weight (1,84 gr/fetus vs 2,11 gr/fetus control) without affecting fetal viability. These results show that DHEA administration inhibits totally and selectively embryo development, while its administration on a later period (fetal growth) only affects fetal weight.

### Key words:

dehydroepiandrosterone, embryo development, mechanism.

## INTRODUCCIÓN

La dehidroepiandrosterona (DHEA) y su ester sulfato (DHEA-S), son los esteroides más abundantes producidos por la corteza suprarrenal de muchas especies, incluyéndose el hombre, sin embargo su función específica aún no está definida<sup>(1)</sup>. Se sabe que la secreción de DHEA-S disminuye con la edad pero el significado funcional es incierto<sup>(2)</sup>; evidencias clínicas y experimentales sugieren que este andrógeno juega un rol importante en la prevención de la arterioesclerosis<sup>(3,4)</sup>, de la obesidad<sup>(5)</sup> y del cáncer<sup>(6,7,8)</sup>.

Por otra parte es bien conocida la asociación entre niveles elevados de andrógenos y alteraciones en la función reproductiva de la mujer<sup>(9,10,11,12)</sup>. Una hiperfunción de la glándula suprarrenal produce un aumento importante en los niveles de DHEA-S la cual, además de ser un andrógeno débil, es sustrato para la síntesis de andrógenos más potentes<sup>(13)</sup>. En mujeres embarazadas con hiperandrogenismo se ha reportado un aumento en la frecuencia de muerte fetal<sup>(14)</sup> y experimentalmente se ha demostrado que

la administración de DHEA inhibe la blastogénesis (15,16). El efecto de la hiperandrogenemia podría ser directo sobre el embrión y/o indirecto sobre el endometrio o sobre el cuerpo lúteo. Recientemente se demostró que la administración de DHEA, durante los primeros 4 días de la preñez en ratas, afecta directamente la formación del blastocisto pero no la función del cuerpo lúteo(16). Si el efecto es selectivo para el embrión, un aumento en los niveles de la DHEA durante cualquier período de la preñez, debería afectar el número y el desarrollo normal de los embriones. Este trabajo tiene como objetivo estudiar los efectos de la administración de la DHEA, durante las diferentes etapas de la preñez de la rata (implantación, embriogénesis y crecimiento fetal), sobre el desarrollo del embrión.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales:

Se utilizaron ratas Wister con un peso promedio de  $200 \pm 10$  gr, colocadas en jaulas individuales con comida y agua a voluntad. El día del proestro, las ratas se aparearon con machos de fertilidad probada y a la mañana siguiente, se corroboró la presencia de espermatozoides en la vagina. Este día se consideró como el primer día de la preñez.

### Esteroides:

La solución de dehidroepiandrosterona (Merck), se preparó en etanol y aceite de maíz comercial (1:9), se administró por vía subcutánea en un volumen de 0.1 ml, y la dosis utilizada fue de 20 mg/Kg de peso.

### Experimentos:

A. Se conformaron 3 grupos de ratas preñadas; en cada grupo la mitad de las ratas fueron tratadas con DHEA a dosis de 20 mg/Kg de peso (experimentales) y las restantes, fueron inyectadas con el vehículo (controles). Los días seleccionados para administrar la DHEA, corresponden a las etapas del desarrollo embrionario descritas para los roedores(17) y fueron los siguientes:

**Grupo I:** conformado por 12 ratas preñadas, las cuales fueron inyectadas, durante los días 5º al 8º de la preñez. Durante este intervalo de tiempo, el embrión en estadio de blastocisto llega al útero y se implanta en el endometrio (etapa de implantación).

**Grupo II:** conformado por 12 animales, los cuales fueron inyectados durante los días 9º al 14º de la preñez. Durante este período el embrión ya implantado experimenta su desarrollo embrionario temprano (etapa correspondiente a la embriogénesis).

**Grupo III:** constituido por 16 ratas, las cuales fueron inyectadas durante los días 15º al 19º de la preñez. Este lapso de tiempo corresponde a la última etapa de la preñez en la cual ocurre el crecimiento fetal.

El día 20 de la preñez, los animales de todos los grupos fueron pesados y sacrificados por sobredosis de éter. Luego de una incisión en la región pélvico-abdominal se les extrajeron los cuernos uterinos; éstos se libraron del tejido graso adyacente y se pesaron en una balanza de precisión (Mettler, H5). Posteriormente se procedió a colocar las muestras en el líquido fijador (Bouin) y al cabo de 72 horas, se disecó la pared del útero y se pesaron individualmente. Los fetos fueron examinados bajo la lupa estereoscópica a fin de establecer la normalidad o anomalía de su conformación externa.

B. Para descartar un posible efecto directo de la DHEA sobre el endometrio, se conformó un grupo de 10 ratas preñadas: 5 fueron inyectadas con DHEA (20 mg/Kg de peso) y 5 con el vehículo (control), durante los días previos a la implantación (días 1º al 4º de la preñez).

Al 5º día los animales se sacrificaron, se les extrajeron los cuernos uterinos e inmediatamente después, los úteros fueron fijados y preparados para su estudio histológico.

### Preparación del tejido para microscopía óptica:

Luego de fijado, el tejido fue deshidratado, incluido en parafina y cortado a 5 micras de espesor. Posteriormente, los cortes se colorearon con hematoxilina y eosina y se observaron en un microscopio Zeiss Standard.

### Análisis estadístico:

El peso de los úteros, así como el número y el peso de los fetos, obtenidos en cada grupo de ratas, se reportó como el valor promedio de cada uno con su respectivo error estándar de la media ( $\pm$  ESM). La significación estadística de la diferencia entre el grupo experimental y el grupo control fue calculada usando la prueba «t» de Student.

## RESULTADOS

### Efecto de la administración de la DHEA durante la etapa de la implantación:

Al examinar macroscópicamente los cuernos uterinos, obtenidos de las ratas que fueron tratadas con la DHEA durante los días 5º al 8º, no se obser-

varon fetos a término sino ligeros abultamientos, los cuales al ser disecados y observados bajo la lupa estereoscópica, resultaron ser pequeñas masas friables de difícil manipulación (Figura 1). Como se puede observar en el Gráfico 1, el peso promedio de los úteros de las ratas tratadas con la DHEA fue de  $0,9858 \pm 0,31$  gr, cifra significativamente menor que la obtenida en su correspondiente grupo control ( $44,70 \pm 2,96$  gr) en el cual se obtuvieron fetos a término y viables. Para determinar si el defecto en el desarrollo del embrión pudiera ser ocasionado por algún efecto de la DHEA sobre el endometrio, se comparó histológicamente el endometrio de las ratas tratadas con la DHEA durante los 4 primeros días de la preñez con el de ratas preñadas no tratadas con la DHEA. La observación microscópica indica que no existen diferencias histológicas entre el endometrio de las ratas tratadas y sus respectivos controles (Figuras 2a y 2b).

#### **Efecto de la administración de la DHEA durante la etapa de la embriogénesis:**

Al estudiar los cuerpos uterinos de las ratas tratadas con la DHEA durante los días 8º al 14º de la preñez, tampoco se obtuvieron fetos a término; sólo se encontraron pequeños botones embrionarios, los cuales al ser observados bajo microscopio estereoscópico resultaron ser acúmulos de material semi-sólido, sanguinolento y difícil de manipular (Figura 3). Como se muestra en el Gráfico 1, el peso promedio de los úteros de las ratas tratadas fue de apenas  $1,10 \pm 0,87$  gr, que comparado con el peso promedio obtenido para los úteros del grupo control ( $46,73 \pm 3,66$  gr) fue significativamente menor ( $p < 0,001$ ).

#### **Efecto de la administración de la DHEA durante la etapa de crecimiento fetal:**

Al examinar los cuernos uterinos de las ratas tratadas con la DHEA, durante los días 14º al 19º de la preñez, pudo detectarse un estado de gravidez evidente, con un promedio de  $9,2 \pm 2,0$  fetos vivos por animal. Esta cantidad no difirió del número obtenido en el grupo de control, el cual presentó un promedio de  $10,5 \pm 1,5$  fetos vivos por rata. Según puede apreciarse en el Gráfico 1, el peso promedio de los úteros de las ratas tratadas fue de  $31,20 \pm 1,99$  gr, en tanto que el obtenido en el grupo de control fue de  $45,34 \pm 2,01$  gr. La diferencia fue estadísticamente significativa ( $p < 0,005$ ). A fin de descartar que la disminución del peso uterino, obtenida en los animales tratados, pudiera deberse a una reducción global del peso corporal, se calculó el peso uterino relativo (peso uterino  $\times 100$  / peso corporal). En el grupo ex-

perimental el peso uterino relativo fue de 11,35%, mientras que en el grupo control fue de 16,63%; esto indica que la reducción en el peso uterino no fue debida a una reducción del peso corporal pero sí a una disminución en el peso de los fetos, lo cual fue comprobado al pesar individualmente cada uno de ellos. El peso promedio de los fetos provenientes del grupo experimental fue de  $1,84 \pm 0,069$  gr, en tanto que para el control fue de  $2,11 \pm 0,032$  gr; la diferencia fue altamente significativa ( $p < 0,0001$ ).

Al examen estereoscópico, los fetos obtenidos de las ratas tratadas con la DHEA, no mostraron anomalías anatómicas ni anomalías del desarrollo externo; las características morfológicas de la cabeza, el tórax, el abdomen, las extremidades anteriores y posteriores y la cola, fueron similares a aquéllas observadas en los fetos procedentes de las ratas controles (Figuras 4a y 4b).

#### **DISCUSIÓN**

Los resultados obtenidos en este trabajo, aunados a los ya reportados<sup>(15,16)</sup>, indican que un aumento en los niveles de la DHEA durante cualquier período de la preñez de la rata, tiene un efecto inhibitorio sobre el desarrollo del embrión. Un efecto similar de la DHEA también ha sido descrito en tejidos hematopoyéticos de roedores<sup>(18)</sup>, en los cuales se describe inhibición de la linfocitopoyesis pero no de la mielopoyesis; los mecanismos que definen esta especificidad se desconocen<sup>(19)</sup>.

Cuando la DHEA se administró durante los días correspondientes a la etapa durante la cual ocurre la implantación, el embrión no se desarrolló a pesar de la existencia de un endometrio histológicamente normal. La presencia de los botones embrionarios en los cuernos uterinos nos permite sugerir que los blastocistos se implantaron pero los niveles elevados de la DHEA inhibieron su desarrollo. Este efecto inhibitorio directo y aparentemente selectivo de la DHEA sobre las células embrionarias, también se presentó cuando ésta se administró durante la etapa posterior a la implantación (etapa de embriogénesis). En este período del desarrollo, los úteros de las ratas tratadas con la DHEA presentaron pequeños botones embrionarios atrofiados, que contrastaron con los fetos a término obtenidos de las ratas controles.

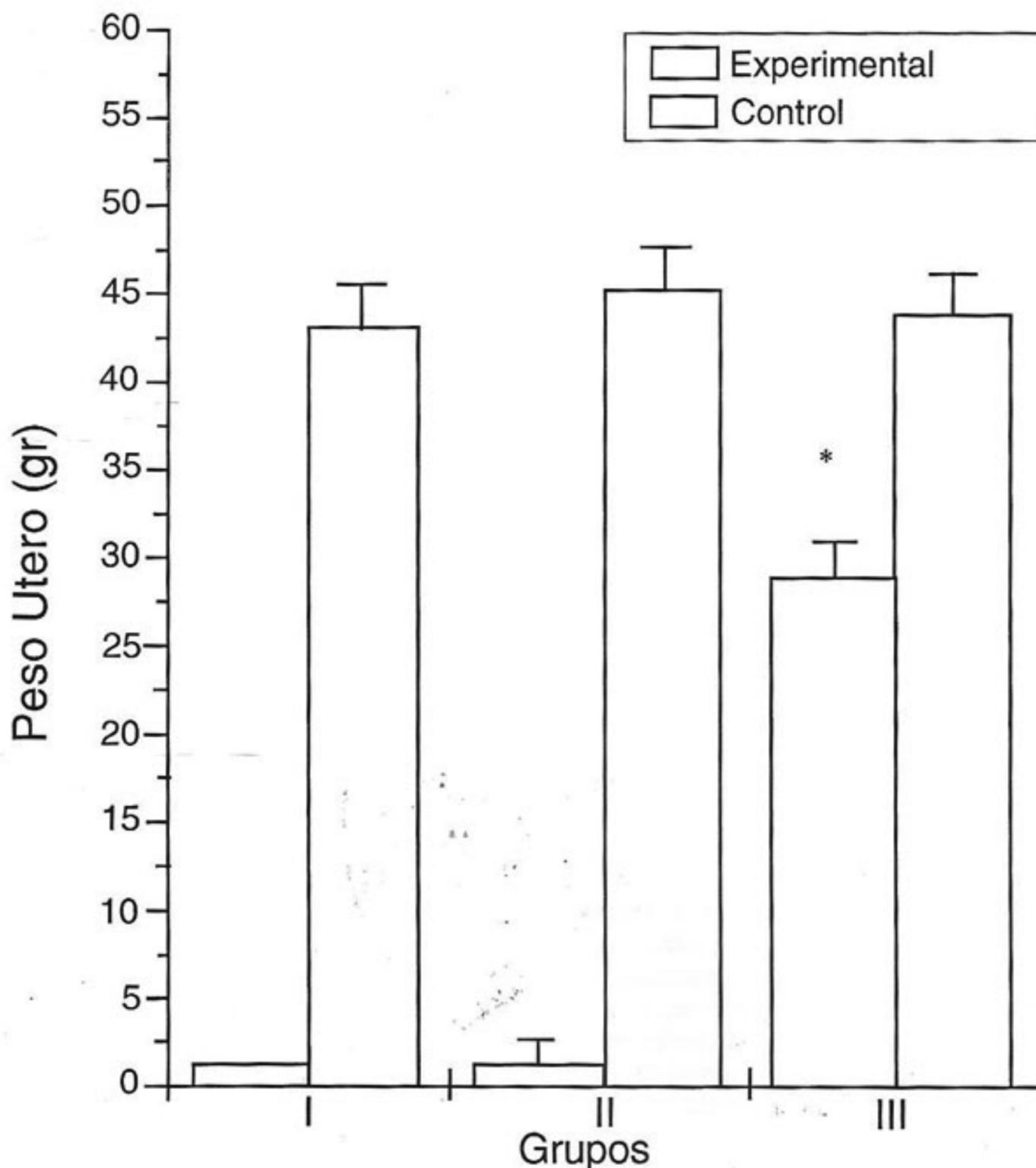
Cuando la DHEA se administró durante el último período de la preñez, también se observó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento fetal, puesto de manifiesto por una reducción significativa en su peso. El hecho de que las características morfológicas macroscópicas no se hayan alterado sugiere que, du-

rante este período, las células embrionarias estarían lo suficientemente diferenciadas y por lo tanto, parecerían ser menos susceptibles a la acción de la DHEA. La reducción en el peso de los fetos por el efecto de la administración de la DHEA, podría atribuírsele a una posible disminución en el número o en la velocidad de las divisiones celulares. Este

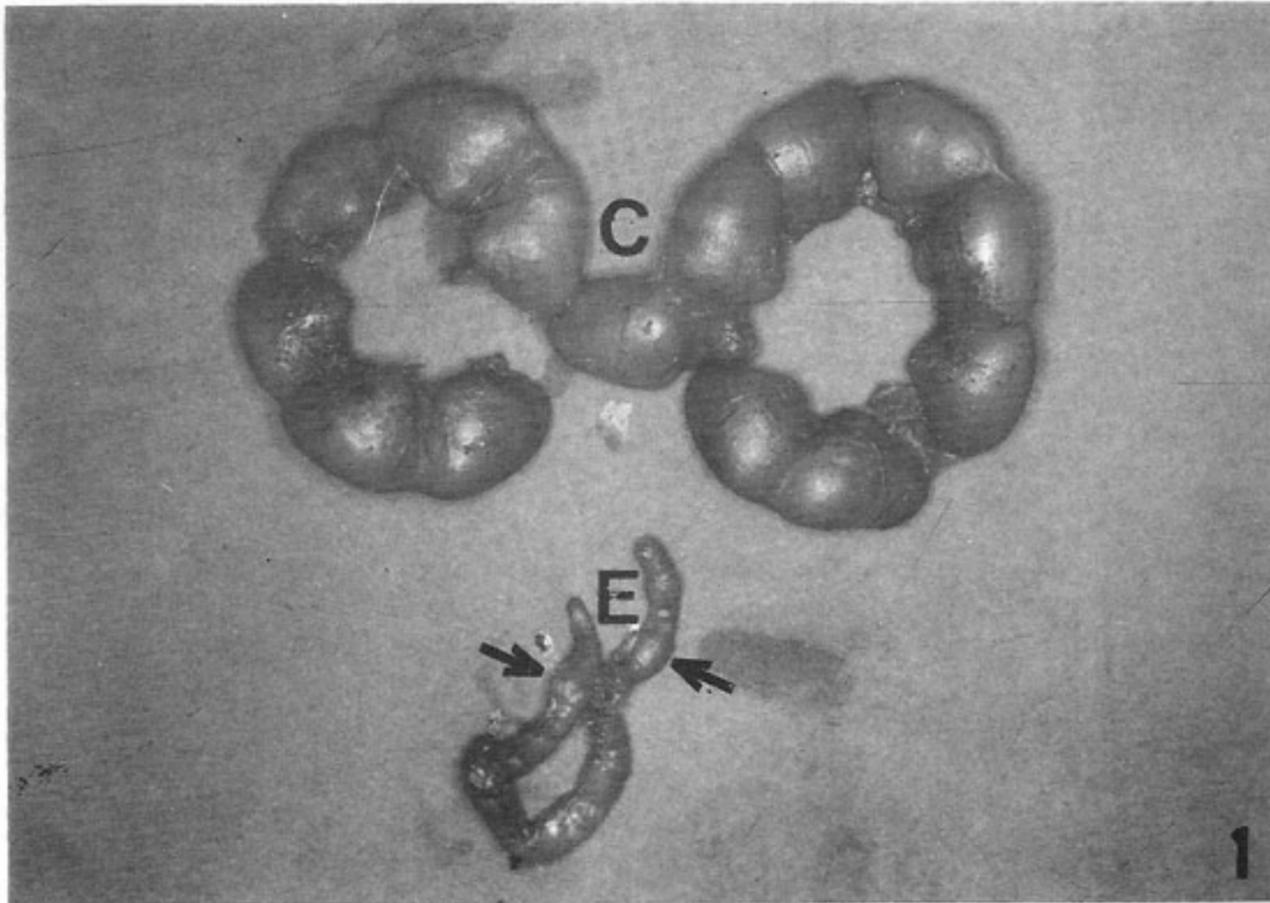
hecho probablemente sea debido a una falla en la duplicación del ADN, ya que experimentalmente se ha demostrado que la DHEA inhibe la glucosa o fosfato dehidrogenasa, lo cual limita la síntesis de las pentosas, indispensables para la duplicación de este ácido nucleico<sup>(20,21)</sup>, condición previa necesaria para que ocurra la mitosis.

### Gráfico 1

**Efecto de la administración de 20 mg/kg de DHEA sobre el desarrollo embrionario en ratas**

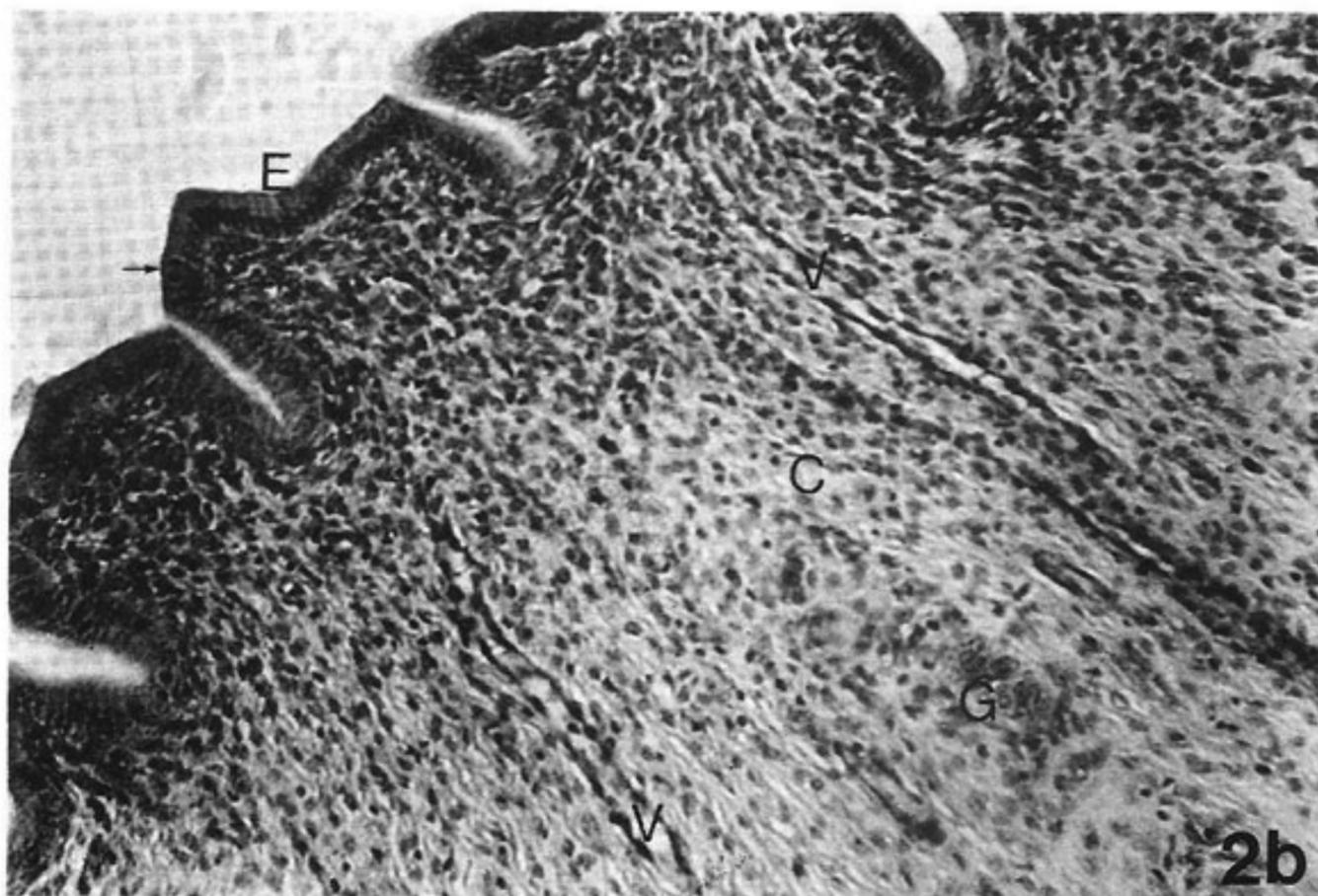
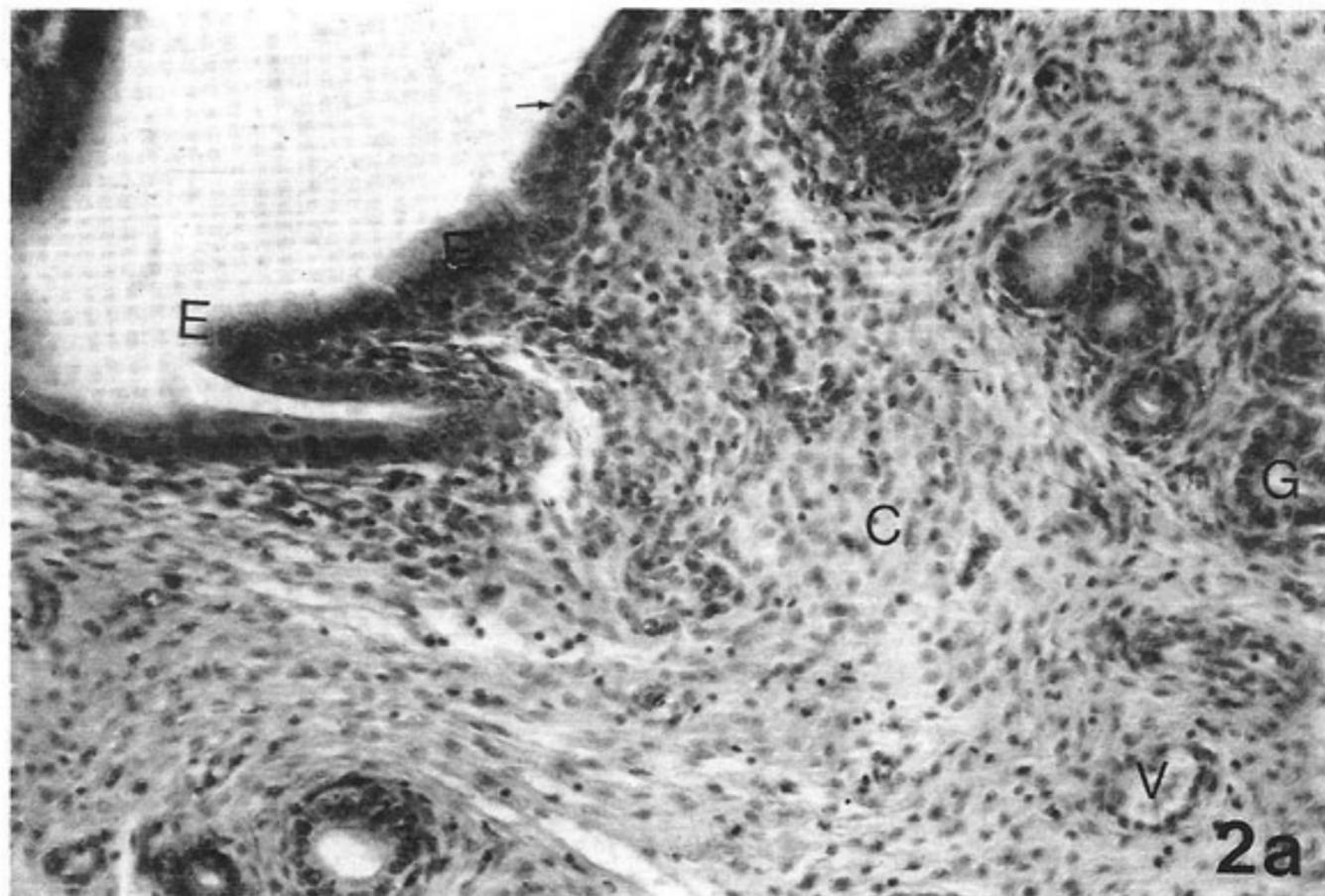


Grupo I: Inyectadas los días 5º a 8º de preñez (implantación).  
 Grupo II: Inyectadas los días 9º a 14º de preñez (embriogénesis).  
 Grupo III: Inyectadas los días 15º a 19º de preñez (crecimiento fetal).  
 \* p < 0.005 vs Control.



**Figura 1**

**Cuernos uterinos de ratas control (C) y experimental (E).  
Nótense los pequeños abultamientos (flechas) en el útero de la rata experimental tratada con DHEA durante el período de implantación.  
(Lupa estereoscópica x0.5)**



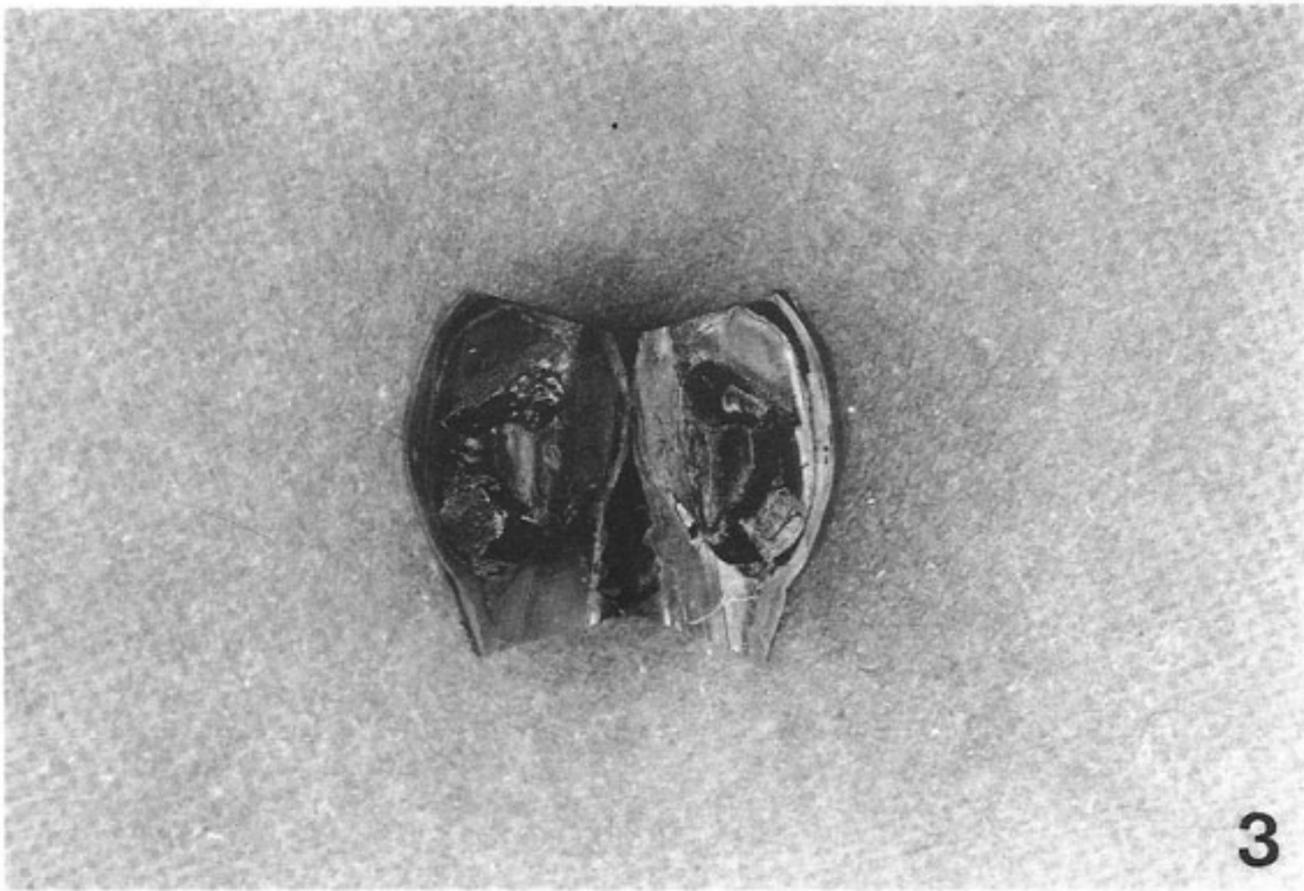
**Figuras 2a y 2b**

**Cortes histológicos de la mucosa uterina (endometrio) de rata experimental (2a) y control (2b).**

**No se observaron diferencias microscópicas entre ambas. E: epitelio; flechas: figuras mitóticas; C: corion; V: vasos; G: glándulas.**

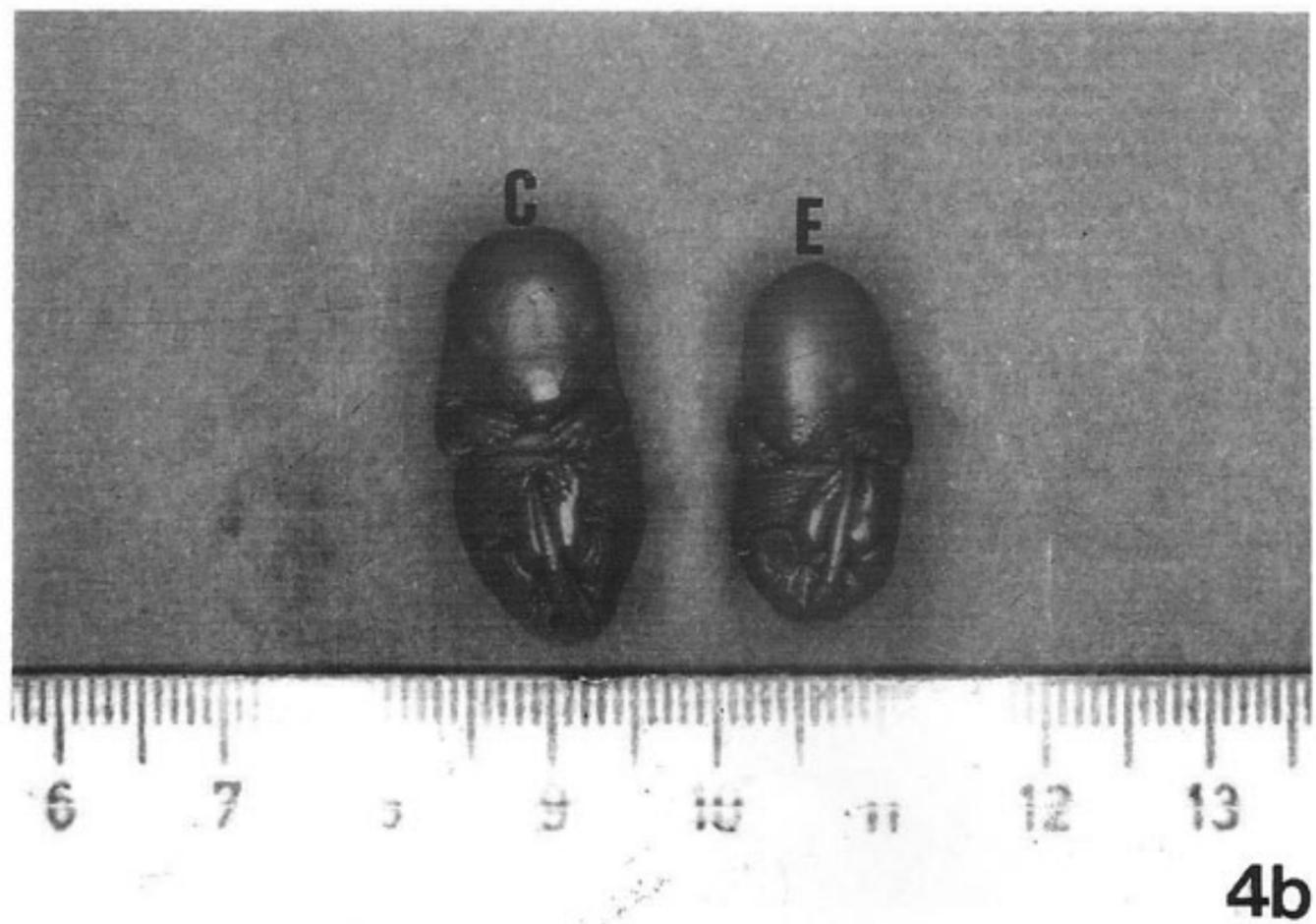
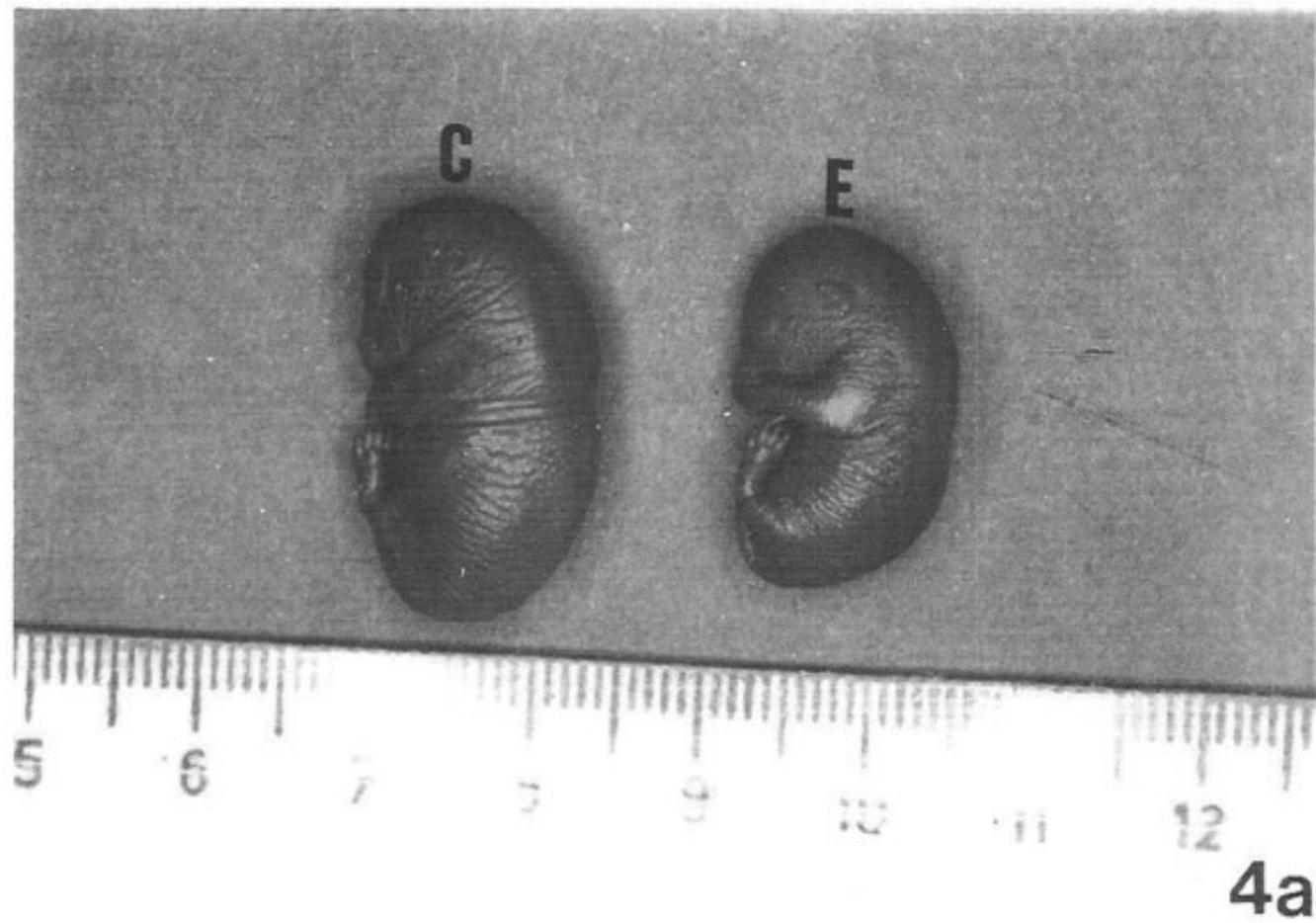
**Coloración: Hematoxilina eosina.**

**Microscopio óptico x250.**



**Figura 3**

**Botón embrionario obtenido de una rata experimental, tratada con DHEA durante el período de la embriogénesis y sacrificada el día 20º de la preñez. Microscopio óptico x20.**



**Figuras 4a y 4b**

**Vistas lateral (4a) y frontal (4b) de fetos controles (C) y experimentales (E) tratados con DHEA durante el período de crecimiento fetal. Lupa estereoscópica x2.**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NESTLER, J.E.; CLORE, J.N. and BLACHARD, W.G. «Metabolism and actions of dehydroepiandrosterone in humans». *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 40, 599-605, 1991.
2. ORENTREICH, N; BRIND J.L.; RIZER, R.L. and VOGELMAN, J.H. «Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations through adulthood». *J. Endocrinol. Metab.* 59, 551-555, 1984.
3. BARRET-CONNOR, E; KHWA, T and YEN S.C. «A prospective study of dehydroepiandrosterone sulfate, mortality and cardiovascular disease». *N. Engl. J. Med.* 315, 1519-1524, 1986.
4. LACROIW, A.Z; YANG, K. and REED, D.M. «Dehydroepiandrosterone sulfate, incidence of myocardial infarction, and extent of atherosclerosis in men». *Circulation* 86, 1529-1535, 1992.
5. SCHWART, A.G; HARD, G.C; PASHKO, L.L; ABOU-GHARBIA, M and SWERN, D. «Dehydroepiandrosterone an anti-obesity and anti-carcinogenic agent». *Nutr. Cancer* 3, 46-53, 1981.
6. MOON, R.C. «Inhibition of rat mamary gland chemical carcinogenesis by dietary dehydroepiandrosterone or a fluorinated analogue of DHEA». *Cancer Res.* 51, 481-486, 1991.
7. HELZLSOUER, K.J; GORDON, G.B; ALBERG, A.J; BUSH, T.L. and COMSTOCK, G.W. «Relationship of prediagnostic serum levels of dehydroepiandrosterone to the risk of developing premenopausal breast cancer». *Cancer Res.* 52, 1-4, 1992.
8. BOCOZZI, G; ARAGNO, M. and BRIGNARDELLO, E. «Opposite effects of dehydroepiandrosterone on the growth of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced rat mamary carcinomas». *Anticancer Res.* 12, 1479-1483, 1992.
9. LOBO, R.A. «Androgen excess and infertile woman». *Obstet. Gynecol. Clin. Med. N.A.* 14, 955-978, 1978.
10. LOBO, R.A; WELLINGTON, P; MARCH C.M. and GRANGER, L. «Clomiphene and dexametasone in women unresponsive to clomiphene alone». *Obstet Gynecol* 60, 497-501, 1982.
11. KOWALSKI, W. and CHATERTON, R.T. «Effects of subchronic infusion of dehydroepiandrosterone sulfate on serum gonadotropin levels and ovarian function in the cynomolgus monkey». *Fertil. Steril.* 57, 912-920, 1992.
12. PARKER, C.R. and MAHESH, V.B. «Interrelations between excessive levels of circulating androgens in blood and ovulatory failure» *J. Reprod. Med.* 17, 75-90, 1976.
13. HANING, V; FLOOD, C.A; HACKETT, R.J; LOUGHLING, J.S; MAC-CLURE, N. and LONGOSCOPE, C. «Metabolic clearance rate of dehydroepiandrosterone in vivo». *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70, 1088-1095, 1991.
14. SIDEL'NIKOVA, V.M; ORLOVA, V.G; RAISOVA, A.T. and AGADZHANOVA, A.A. «Diagnosis of the causes and prevention of intrauterine fetal death in the second trimester of pregnancy in women with hyperandrogenism». *Akush. Ginekol. Mosk.* 10, 16-19, 1991.
15. PROUGH, S.G; AKSEL, S; YEOMAN, R.R. and WIEBE, R.H. «Peritoneal fluid from patients with unexplained infertility inhibits growth of 2 cell mouse embryos». *Int. J. Fertil.* 36, 13-20, 1991.
16. BELLABARBA, A.G; MOLINA, C. Z; MONTARROSO, A.M; VELAZQUEZ, E; VALERI, P.M. and BELLABARBA C. «Dehidroepiandrosterona y preñez en la rata». *Rev. Obstet. Ginecol. Venez.* 53, 203-206, 1993.
17. ROBERTS, R. «The mouse. Its reproduction and development». Ed. Burgers Publishing Company, 1967.
18. RISDON, G; COPE, J. and BENNETT, M. «Mechanisms of chemoprevention by dietary dehydroepiandrosterone. Inhibition of lymphopoiesis». *Am. J. Phatol.* 136, 759-769, 1990.
19. BLAUER, K.L; ROGERS, W.M. and BEMTHON, E.W. «Dehydroepiandrosterone antagonizes the suppressive effects of glucocorticoids on lymphocyte proliferation». *The Endocrine Society Proceeding of 71st Annual Meeting, Baltimore, Williams and Williams. Abstr.* 29, 1989.
20. MARKS, P.A. and BANKS, J. «Inhibition of mammalian glucose-6-phosphate-dehydrogenase by steroids». *Proc. Natl. Acad. Sci.* 46, 447-452, 1960.
21. FEO, F; DAINO, L; SEDDAIU, M.A; SIMILE, M.M; PASCALR, R; McKEATING, J.A; DAVLIAKOS, G.P; SUDOL, K.S. and RAO, K.N. «Differential effects of dehydroepiandrosterone and deoxyribonucleosides on DNA synthesis and the novo cholesterologenesis in hepatocarcinogenesis in rats». *Carcinogenesis* 12, 1581-1586, 1991.

## AGRADECIMIENTO

A la Sra. Aurora Prieto por su valiosa asistencia técnica.

Al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes por el soporte económico: Proyecto M 407-92.

# RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA: EFECTOS DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO

Zambrano, Midalia Josefina.  
Villasmil Bastidas, Saúl Antonio.

Tutor: Lic. Gabriela Arata de Bellabarba, MSc.

Colaboradores: Dr. Argenis Torres Morales  
Dra. Carmen Zoraida Molina

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA - ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
Mérida - Venezuela  
1995

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al Título de Licenciado en Bioanálisis.

## AGRADECIMIENTO

A la Ilustre Universidad de Los Andes por habernos brindado todos los conocimientos para nuestra realización profesional.

A la Licenciada Gabriela Arata de Bellabarba, Jefe del Laboratorio de Neuroendocrinología de la Reproducción, por su desinteresado apoyo para la consecución de nuestro proyecto.

A la Licenciada Ana María Montarroso por sus correcciones y opiniones orientadoras en este trabajo.

A la Licenciada Gladys Marín de López Jefe del Departamento de Fisiopatología, lugar donde se realizó este trabajo.

Al Dr. Argenis Torres Morales por la colaboración en nuestro trabajo.

A la Licenciada Cecilia Le Morvan por su asistencia en el laboratorio.

A la Dra. Carmen Molina por su colaboración en este trabajo.

A la Sra. Carmen A. Prieto por su inapreciable ayuda en el trabajo de laboratorio.

Al Sr. Luis Rodríguez A. por su ayuda en el laboratorio.

A mis compañeros Anny Lacruz, Doritzá Vargas, Ingrid Velarde, Tatiana Galeazzi por su dedicada solidaridad y compañerismo.

A los pacientes que sin su aporte no se hubiese realizado este proyecto.

## RESUMEN

La adición de suero, al medio utilizado en la preparación del semen para la fecundación asistida, permite mejorar la recuperación de espermatozoides móviles. En este trabajo se comparó el efecto que sobre la recuperación espermática puede tener el uso de sueros provenientes de hombres o de mujeres en distintas etapas de la vida. Se utilizó Ham's F-10 como medio de cultivo enriquecido al 10% con suero de hombres (M1), de mujeres en fase folicular (M2, en fase lútea (M3), embarazadas (M4), menopáusicas (M5) y con albúmina bovina al 3% (M6). También se estudió el efecto de sustituir el Ham's F-10 por solución salina (SS) a la cual se le agregó suero en fase folicular al 25% (M0). Once muestras de semen, con parámetros seminales normales, se lavaron utilizando la técnica del doble lavado con migración ascendente. Cada muestra fue lavada y resuspendida en los diferentes tipos de medios y el número de espermatozoides móviles recuperados se evaluó a las 2h, 4h, 6h, y 8h de incubación. Los resultados obtenidos muestran que el porcentaje de espermatozoides recuperados no fue diferente entre los medios preparados con sueros diferentes (M1 a M5), con la albúmina (M6) y con la salina (M0). La recuperación espermática disminuyó proporcionalmente con el tiempo de incubación, pero no hubo diferencias entre los medios. En consecuencia un medio tan simple como la SS, enriquecido con suero de hombre o de mujer en cualquier etapa de su vida reproductiva puede ser utilizado en la preparación de una muestra de semen. Siendo la concentración de estradiol (E), progesterona (P) y testosterona (T) muy diferente entre los tipos de sueros utilizados se concluye que el tipo y la concentración de esteroides sexuales no afecta la recuperación espermática, lo cual no implica, que los esteroides puedan intervenir en eventos posteriores como la reacción acrosómica.

## INTRODUCCIÓN

La ausencia de hijos deseados se reporta en un 15% de las parejas. Cuando se estudian las causas de la esterilidad se aprecia que en un 35% radica en la mujer, otro tanto le corresponde al hombre, en el 20% se detectan alteraciones en ambos, y en el 10% no se descubre el motivo de la esterilidad. Durante los últimos 30 años los avances obtenidos en el conocimiento de la fisiología reproductiva han mejorado el diagnóstico y el tratamiento de la esterilidad; en un 90% de las parejas se puede definir la causa y de éstos el 70% logra con éxito la solución del problema (1,2).

Entre las alternativas disponibles para solucionar el problema de la pareja estéril está la «fecundación asistida». Con este término se engloban una serie de técnicas cuyo objetivo es el de facilitar la fecundación. La inseminación artificial, ampliamente utilizada en animales, se practicó por primera vez en humanos en 1780; puede realizarse intravaginal o intrauterina (IUI), la ventaja teórica de la IUI sobre la intravaginal es que en la IUI se puede aumentar el número de espermatozoides móviles que llegan al sitio de la fecundación, cuando el número o la movilidad espermática están disminuidas, o cuando hay problemas en el moco cervical(3,4,5). En 1978(6), con el primer nacido vivo, resultado de la fecundación in vitro y de la transferencia de embriones (IVF-ET), se desarrollaron nuevas técnicas para facilitar la fecundación, tales como, la transferencia de gametos en las trompas de Falopio(7), la fecundación de óvulos a los cuales se les ha perforado la zona pelúcida(8) la transferencia de espermatozoides al espacio perivitelino(9) y la macroinyección del espermatozoide en el oolema(10).

Uno de los pasos indispensables para realizar cualquiera de las técnicas antes mencionadas es la preparación de la muestra de semen. En condiciones fisiológicas, una vez que el semen es depositado en la vagina, los espermatozoides abandonan el plasma seminal y comienzan a desplazarse a través del tracto genital femenino hasta alcanzar el óvulo y fecundarlo. El espermatozoide móvil se desplaza a través de la glera cervical y el líquido intratubárico para alcanzar el óvulo, sin embargo, para fecundarlo es necesario que el espermatozoide esté capacitado; esto significa que el contacto del espermatozoide con los diferentes tipos de líquidos presentes en el tracto genital femenino, no sólo le permite desplazarse sino que también lo capacita para penetrar las envolturas del óvulo y fecundarlo(1,11,12). La capacitación es un fenómeno complejo durante el cual, el espermatozoide sufre una serie de cambios subcelulares que se manifiestan por la adquisición de un tipo diferente de movimiento: espermatozoide «hiperactivo» y la capacidad de realizar la reacción acrosómica la cual culmina con la liberación de las enzimas hidrolíticas, la exposición de la membrana acrosomal interna y la modificación del segmento ecuatorial(13,14,15,16). El conjunto de cambios que se producen en el espermatozoide durante su tránsito a lo largo del tracto genital femenino pueden ser inducidos in vitro al eliminar el plasma seminal y resuspender los espermatozoides en un medio adecuado; de la composición del medio dependen el tiempo requerido para la capacitación, el mantenimiento de la movilidad y el % de espermatozoides que culminen la reacción acrosómica (17,18,19, 20,21,22,23). Se han descrito muchos medios cuya composición

varía desde lo más simple como una solución buffer fosfato hasta los más complejos como el Ham's F 10 a los cuales, es indispensable agregarle albúmina o líquido folicular o suero inactivado o líquido amniótico para mantener y estimular la movilidad del espermatozoide e inducir la capacitación<sup>(24,25,26, 27,28,29,30)</sup>; generalmente se recomienda el uso del suero de la mujer en fase folicular, sin embargo, poco se conoce acerca del efecto que pueda tener sobre la movilidad espermática el uso de sueros provenientes de hombres o de mujeres en diferentes etapas. Motivo por el cual, en este trabajo, se comparó el efecto que puede tener un medio de cultivo enriquecido con sueros provenientes de hombres fértiles, mujeres en fase folicular, en fase lútea, menopáusicas y embarazadas sobre la recuperación espermática.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

**1. Reactivos:**

Albúmina bovina y Lactato de sodio (Sigma Chemical Co.); Medio liofilizado Ham's F-10, Penicilina y Estreptomina (Irvine Scientific, Ca.): Cloruro de sodio y Bicarbonato de sodio p.a. (Merck).

**2. Obtención de las muestras de sangre:**

Los sueros utilizados para enriquecer el medio con el cual se prepararon las muestras de semen se obtuvieron de 38 donantes, con los cuales se conformaron 5 grupos: hombres con fertilidad probada (8,H); mujeres cuyo período reproductivo se correspondía con: fase folicular (8, F.F.); fase lútea (10, F.L.); embarazo (6, Em.) y menopausia 86 Mn). En ayunas, se le extrajo a cada donante 12 ml de sangre venosa, se colocó en un tubo de vidrio sin anticoagulante y se dejó 2 horas a temperatura ambiente (T.A.). A continuación se centrifugó la muestra, 15 min. a 3.500 r.p.m. y el suero obtenido se inactivó colocándolo en un baño a 56°C durante 10 min. Tomando volúmenes iguales de suero de cada donante del mismo grupo se prepararon las mezclas de suero respectivas. Cada una de las mezclas se fraccionó y se congeló a -70°C.

**3. Preparación de los medios:**

a. Medio Ham's F-10: el preparado comercial se utilizó según las indicaciones adjuntas. El contenido del sobre se reconstituyó con agua destilada y se le agregaron 1,2 g de bicarbonato de sodio, 0,08 g de penicilina, 0,08 g de estreptomina y 4 ml de lactato de sodio; el volumen final se ajustó a 1 l. La composición del medio se muestra en el anexo No. 1. Para

enriquecer al medio se le agregó suero al 10% y luego se ajustó el pH a 7,4±0,2. Se prepararon 5 tipos de medios enriquecidos: M1 con la mezcla de sueros de los hombres, M2 con la mezcla de sueros de mujeres en F.F., M3 con la mezcla de sueros de mujeres en F.L., M4 con la mezcla de sueros de mujeres embarazadas y M5 con la mezcla de sueros de mujeres menopáusicas. El medio M6 se enriqueció con albúmina bovina al 3% (p/v) Tabla No. 1.

**TABLA 1**  
**MEDIOS UTILIZADOS PARA LA RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA**

TIPOS DE MEDIOS	COMPONENTES
M <sub>0</sub>	SSF + Suero de Mujeres en Fase Folicular*
M <sub>1</sub>	HAM'S F10 + Suero de Hombres Fértiles*
M <sub>2</sub>	HAM'S F10 + Suero de Mujeres en Fase Folicular*
M <sub>3</sub>	HAM'S F10 Suero de Mujeres en Fase Lútea*
M <sub>4</sub>	HAM'S F10 + Suero de Mujeres* Embarazadas
M <sub>5</sub>	HAM'S F10 + Suero de Mujeres Menopáusicas*
M <sub>6</sub>	HAM'S F10 + Albúmina Bovina

SSF = Solución Salina 0.9%.

\* = Suero Inactivado.

b. Solución salina fisiológica al 0,9% (S.S.): la solución se preparó con 9 g de cloruro de sodio para 1 l de agua bidestilada. A partir de la S.S. se prepararon 2 soluciones enriquecidas con la mezcla de sueros de mujer en F.F.; para lavar el semen, la concentración del suero fue del 10% y la otra, para resuspender los espermatozoides lavados, se preparó con suero al 25%. A las soluciones se les ajustó el pH a 7,4±0,2.

#### 4. Recolección y análisis de las muestras de semen:

Las muestras estudiadas se obtuvieron de donantes fértiles con 3 a 5 días de abstinencia sexual. El espermograma se realizó una hora después de la obtención de la muestra y los parámetros seminales se determinaron siguiendo los criterios que recomienda el manual de laboratorio para el examen del semen de la Organización Mundial de la Salud<sup>(31)</sup>. El conteo y la movilidad espermática se evaluaron utilizando la cámara de Mackler.

#### 5. Lavado del semen:

La técnica utilizada fue la del lavado con migración ascendente, swim-up,<sup>(32,33,34)</sup>. Una alícuota del semen (0,3 ml) se diluyó 1:10 con el medio, se mezcló y se centrifugó a T.A durante 7 min con una fuerza centrífuga de 500 g. Inmediatamente después se aspiró el sobrenadante y se repitió el lavado. El precipitado se resuspendió en 0,3 ml de medio; se agitó suavemente y se incubó a  $34 \pm 2$  °C durante 8 horas. Cada 2 horas se tomó una alícuota del medio en la cual se determinó el número de espermatozoides móviles. Cada muestra de semen se procesó simultáneamente con los medios que se estaban evaluando. El % de recuperación se calculó: dividiendo el número de espermatozoides móviles recuperados en cada intervalo de tiempo estudiado, entre el número de espermatozoides móviles presentes en el semen antes del lavado, el resultado se multiplicó por 100.

#### 6. Determinaciones hormonales:

Los niveles de estradiol (E), de testosterona (T) y de progesterona (P), presentes en las 5 mezclas de sueros se cuantificaron por radioinmunoensayo, utilizando los estuches comerciales de Rodioassay Systems Laboratories, Inc.

#### 7. Análisis estadístico:

El porcentaje de recuperación obtenido con cada medio y durante los diferentes intervalos de tiempo estudiados se presenta como media aritmética  $\pm$  el error estándar. La significancia estadística entre las variables se calculó con el uso del análisis de varianza (ANOVA), la t-Student apareada y la regresión lineal.

### RESULTADOS

Las muestras de semen utilizadas fueron seleccionadas en base a 3 parámetros fundamentales: número, movilidad y morfología espermática. Como se muestra en la Tabla No. 2, las 11 muestras te-

nían conteos iguales o superiores a los 62 millones de espermatozoides por ml, el porcentaje de móviles (categoría a más b) fue igual o superior al 49% y los espermatozoides con formas ovaladas normales superaban el 54%.

Como los sueros utilizados para enriquecer el medio de cultivo provenían de individuos en diferentes etapas de su vida reproductiva se determinó, en cada mezcla de sueros, la concentración de esteroides sexuales. En la Tabla No. 3, se muestran las concentraciones de estradiol, testosterona total y progesterona obtenidas en cada mezcla. Con respecto a testosterona se destaca que la concentración en la mezcla de suero de hombres es en promedio 6 veces más alta que en los sueros de las mujeres. En la mezcla de sueros de mujeres embarazadas los niveles de estradiol son 10 y 100 veces más altos que en la fase lútea y que en la mezcla de menopáusicas respectivamente. Niveles altos de progesterona sólo se obtuvieron en las mezclas de sueros de mujeres en fase lútea y en las embarazadas.

En la Tabla No. 4, se muestran los promedios de los porcentajes de recuperación obtenidos con los diferentes tipos de medios. Los valores individuales obtenidos con cada medio y en los intervalos de tiempo estudiados se muestran en los anexos 3, 4, 5, y 6. A las 2 horas de incubación la recuperación espermática obtenida en todos los medios fue muy similar; en el medio enriquecido con el suero de mujeres en fase folicular (M2) se obtuvo el mayor porcentaje de recuperación 68,6% y el menor porcentaje 63,6% se obtuvo en los medios enriquecidos con el suero de mujeres menopáusicas (M5) y con el suero de mujeres embarazadas (M4). En el medio enriquecido sólo con albúmina tampoco se obtuvo un porcentaje de recuperación diferente al obtenido con los sueros; el análisis de varianza entre los seis grupos indica que no hay diferencias estadísticamente significativas. Después de 4 horas de incubación la recuperación obtenida en el medio enriquecido con suero de mujeres en fase folicular no disminuyó 70,8%, a diferencia de todos los demás en los cuales se observó una pequeña disminución, entre el 2% y el 7%; al comparar entre sí los promedios de recuperación obtenidos a las 4 horas no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa. A las 6 horas y a las 8 horas el porcentaje de recuperación disminuyó en todos los medios, pero entre sí, la diferencia no fue estadísticamente significativa. En el medio enriquecido con suero de mujeres en fase folicular (M2), la disminución entre las 2 horas y las 8 horas fue del 11%, mientras que con los otros sueros la disminución en los porcentajes de recuperación fue de aproximadamente un 15% a 17%; el porcentaje de recuperación obtenido con el

medio al cual sólo se le agregó albúmina bovina (M6) fue similar al obtenido con los sueros, durante todos los intervalos de tiempo estudiados.

La disminución de la movilidad fue directamente proporcional al tiempo de incubación; como se puede observar en las Figuras Nos. 1, 2 y 3, la relación entre la recuperación espermática y el tiempo de incubación se ajustó muy bien a una recta de regresión.

Al estudiar qué efecto podría tener sobre la recuperación espermática el sustituir un medio de cultivo muy completo por solución salina, pudimos comprobar que al lavar la muestra de semen con S.S. enriquecida al 10% con suero de mujer en fase foliular y luego, realizar la migración ascendente en

SS con suero al 25% (M0), el porcentaje de recuperación espermática obtenido no fue estadísticamente diferente del obtenido con el Ham's-F10 enriquecido con el mismo tipo de suero (M2). La concentración de suero presente en la SS fue suficiente para mantener y estimular la movilidad espermática aún después de 8 horas de incubación; como se muestra en la Tabla No. 5, el porcentaje de recuperación espermática a las 8 horas en el M0 no fue diferente del porcentaje observado con el M2. En la Figura No. 4 se puede apreciar como, en función del tiempo, el comportamiento de los espermatozoides resuspendidos en la SS fue muy similar al de los espermatozoides resuspendidos en el Ham's F-10.

**TABLA 2**  
**CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS DE SEMEN**

PARÁMETROS	DONANTES										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Espermatozoides (millones x ml)</b>	62	126	77	80	150	140	72	96	84	100	91
<b>Movilidad % A + B*</b>	73	85	79	58	86	80	57	56	49	82	65
<b>% Normales</b>	79	72	60	70	77	71	55	69	80	72	65

\* = A + B (Rápidos más lentos)

TABLA 3

**NIVELES DE ESTEROIDES SEXUALES EN LAS  
MEZCLAS DE SUEROS**

	E2	P4	T
SUERO	pg/ml	ng/ml	ng/dl
Mujeres en Fase Folicular	110,0	0,3	88,0
Mujeres en Fase Lútea	295,0	10,8	99,0
Mujeres Embarazadas	3000,0	40,0	92,0
Mujeres Menopáusicas	18,0	0,2	120,0
Hombres Fértiles	45,0	0,2	620,0

E2 = Estradiol, P4 = Progesterona, T = Testosterona.

TABLA 4

**EFFECTO DE LOS TIPOS DE SUERO AGREGADOS AL  
MEDIO SOBRE LA RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA**

HORAS	% DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS						F
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	
2	64,3±4,8	68,6±2,9	67,6±3,9	63,6±4,8	63,6±4,9	66,8±5,5	ns
4	57,3±4,1	70,8±4,9	60,9±6,0	58,6±5,3	56,7±4,6	62,6±4,8	ns
6	53,9±5,6	60,4±4,1	53,9±5,8	50,4±4,5	53,4±4,7	50,0±4,5	ns
8	47,8±4,4	57,6±4,5	52,1±6,0	46,7±3,9	47,5±4,8	49,7±4,9	ns

F: Fisher Anova.  
ns = no significativo.

**TABLA 5**

**EFFECTO DE LOS TIPOS DE SUERO AGREGADOS AL MEDIO SOBRE LA RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA**

TIEMPO	% DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS		p*
	M2	M0	
2 h	68,6±2,9	73,4±5,5	ns
4 h	70,8±4,9	65,4±4,0	ns
6 h	60,4±4,1	59,5±5,6	ns
8 h	57,6±4,5	54,6±4,2	ns

\* = t de Student apareada

**Figura 1**

**EFFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN SOBRE LA RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA**

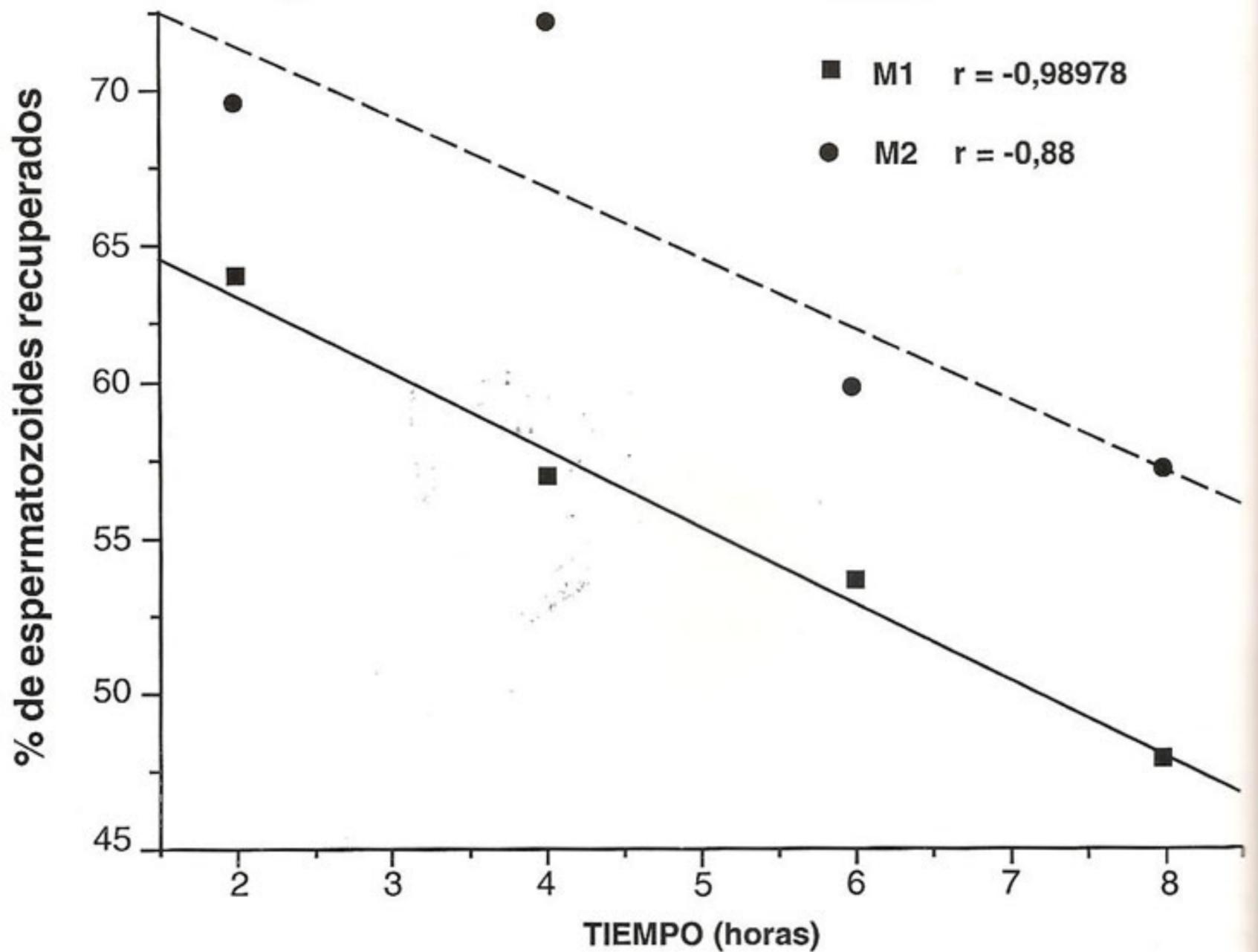


Figura 2

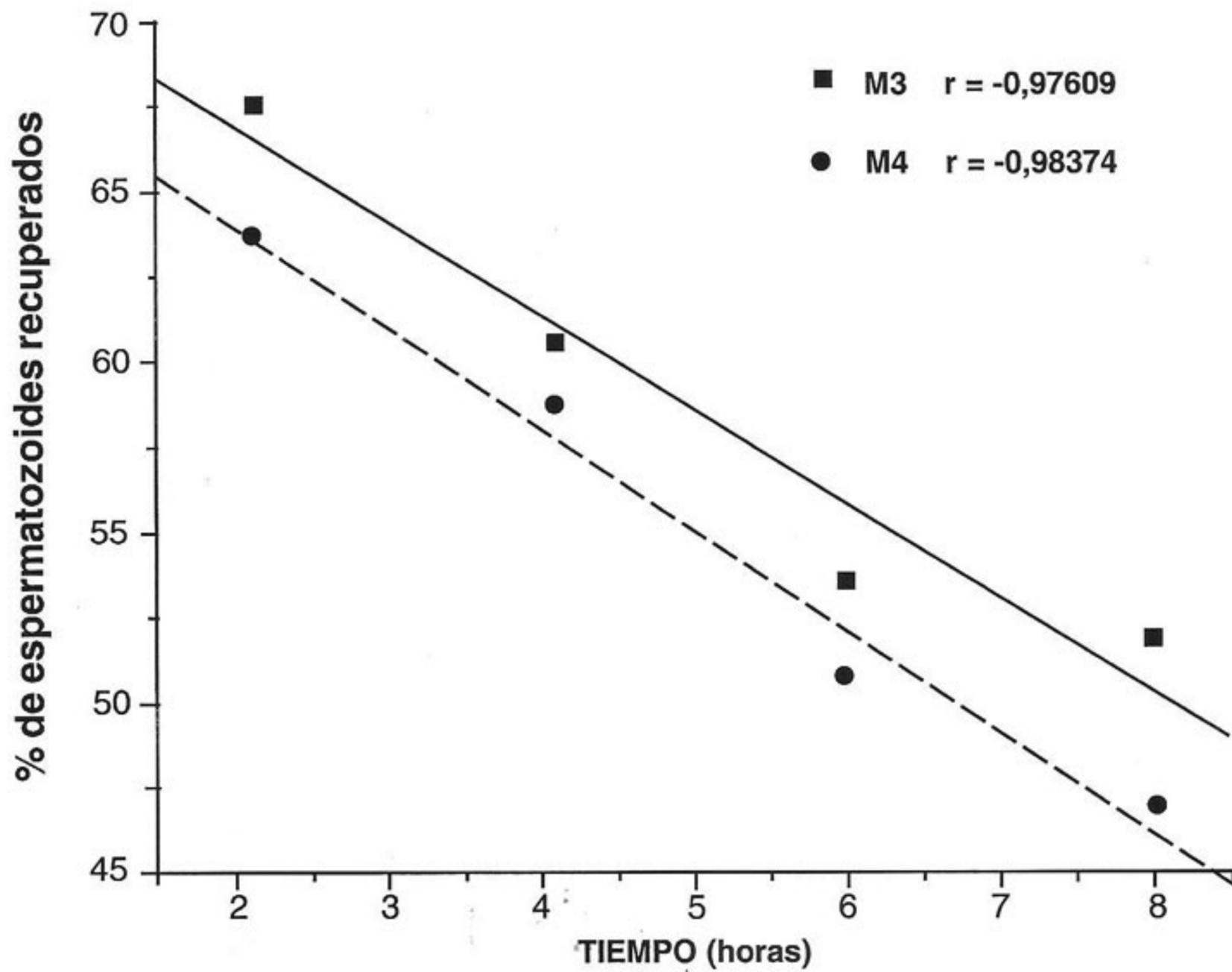
**EFFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN SOBRE  
LA RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA**

Figura 3

EFFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN SOBRE LA RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA

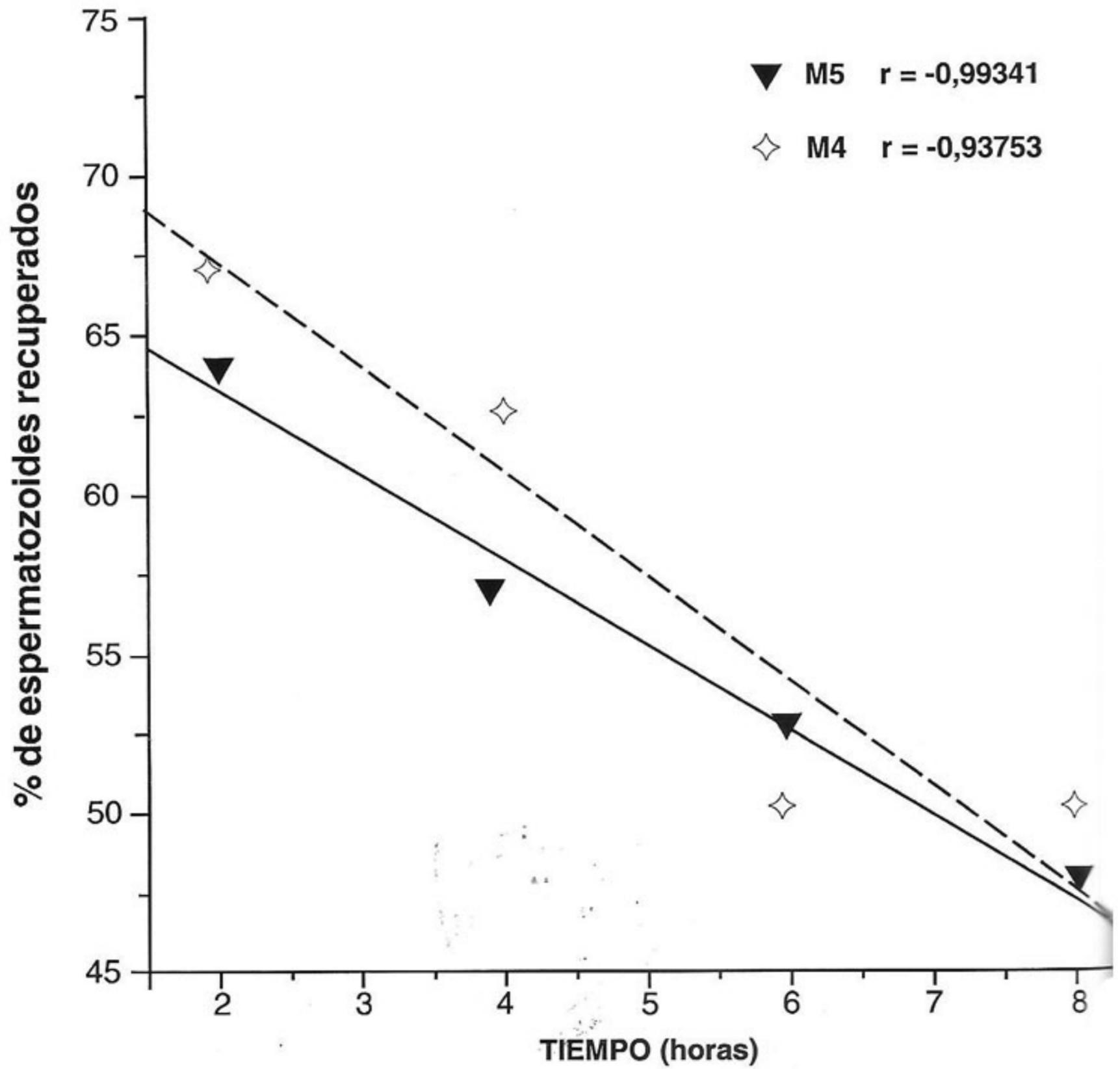
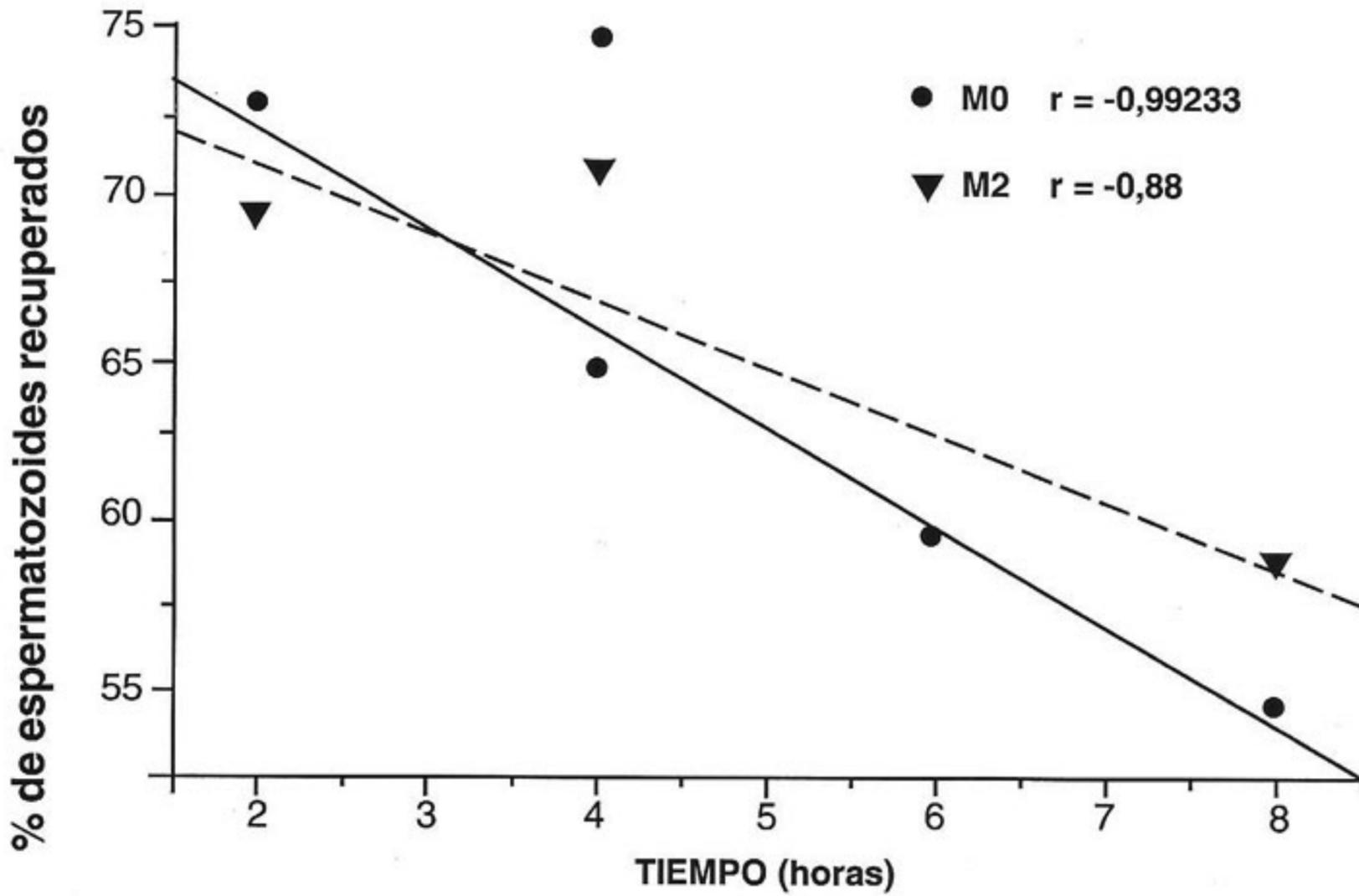


Figura 4

EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN SOBRE  
LA RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que con los diferentes tipos de sueros utilizados, el porcentaje de recuperación espermática fue muy similar aun cuando, las concentraciones de esteroides sexuales presentes en los sueros fueron muy diferentes entre sí. Los efectos que los esteroides sexuales, exógenos, ejercen sobre el metabolismo energético y la movilidad de los espermatozoides no son concluyentes debido, en gran parte, a los diferentes modelos utilizados para los estudios<sup>(35, 36, 37)</sup>. Beck y Col<sup>(38)</sup>, estudiaron la migración de los espermatozoides humanos a través de un capilar, en el cual colocaron individualmente estradiol, testosterona, progesterona, norgestrel y linestrenol, disueltos en solución Tyrode. Bajo estas condiciones, el estradiol fue el más efectivo en estimular la movilidad de los espermatozoides mientras que, los progestágenos la inhibieron. Otros autores observaron que los progestágenos, *in vitro* e *in vivo*, inhiben la migración de los espermatozoides a través de la glera cervical<sup>(39,40)</sup> y que el estradiol, no tiene ningún efecto sobre la movilidad espermática<sup>(39)</sup>. Posteriormente, se demostró que los efectos obtenidos al incubar espermatozoides lavados con los esteroides se anularon cuando los espermatozoides fueron resuspendidos en suero<sup>(41)</sup>. Estos autores sugieren que en el suero hay otros factores que mejoran la movilidad espermática y que contrarrestan el efecto inhibitorio de la progesterona. Nuestros resultados muestran, que la recuperación espermática obtenida con los sueros, no fue diferente de la obtenida con albúmina sola; esto sugiere, que los esteroides sexuales no afectan la movilidad de los espermatozoides lavados. Como entre los diferentes tipos de sueros no hubo diferencias, también se puede concluir que la concentración y el tipo de esteroide presente en el suero, no modifica la movilidad espermática. Es importante señalar que estas conclusiones, no descartan, que los esteroides sexuales puedan influir en la secuencia de eventos que se suceden durante la capacitación y la fecundación. El líquido folicular, también utilizado para resuspender los espermatozoides lavados, es un medio con elevadas concentraciones de esteroides sexuales<sup>(42)</sup> al

cual, se le atribuyen, además del efecto estimulante sobre la movilidad espermática, un efecto facilitador de la entrada de calcio al espermatozoide y un efecto facilitador en la inducción de la reacción acrosómica<sup>(27,28,29)</sup>. Trabajos recientes sugieren, que la progesterona presente en el líquido folicular, sería la responsable de facilitar, a través de un efecto no genómico, la entrada de calcio al espermatozoide y la inducción de la reacción acrosómica<sup>(43, 44)</sup>; también se plantea la posibilidad de que un defecto en el receptor a progesterona del espermatozoide podría ser el factor responsable en algunos casos de esterilidad masculina<sup>(45)</sup>.

Hay que destacar el alto porcentaje de recuperación obtenido con la metodología utilizada; este resultado depende, como lo han señalado otros autores<sup>(18, 19, 20, 24, 25, 32, 22)</sup>, de la fuerza centrífuga aplicada, de la presencia de albúmina en el medio seleccionado para lavar el semen, de la concentración de hidrogeniones y de las características individuales de la muestra de semen. Si estos factores se toman en cuenta se obtiene un número elevado de espermatozoides móviles, que se mantienen activos durante un tiempo prolongado. El medio utilizado para la obtención de espermatozoides móviles no necesariamente tiene que ser el Ham's F-10, nuestros resultados muestran que, éste, puede ser sustituido por solución salina. La presencia de la albúmina en el medio es indispensable para, proteger los espermatozoides del efecto perjudicial de la fuerza centrífuga y para iniciar la capacitación<sup>(13, 16, 20)</sup>. Si se utiliza albúmina comercial la concentración mínima suficiente es del 3%; pero cuando se utiliza suero al 10% la concentración de albúmina resultante está cerca del 0,3%, sin embargo ésta es suficiente para obtener una movilidad similar o superior a la obtenida con la albúmina. Esta diferencia es atribuida a los múltiples factores presentes en el suero capaces de estimular la movilidad espermática<sup>(19, 20, 21, 22, 23)</sup>. En la práctica, los resultados obtenidos muestran que para la preparación de una muestra de semen con un elevado número de espermatozoides móviles, se puede utilizar solución salina enriquecida con suero de hombre o de mujer indistintamente.

## Anexo 1

## COMPOSICIÓN DEL HAM'S F-10

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (mg/ml)
<b>SALES INORGÁNICAS</b>	
CaCl <sub>2</sub> (anhídrido)	33,29
CuSO <sub>4</sub> - 5H <sub>2</sub> O	0,0025
FeSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O	0,834
KCl	285,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	83,0
MgSO <sub>4</sub> (anhídrido)	74,64
ClNa	7.400,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhídrido)	153,7
ZnSO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O	0,0288
<b>Otros Componentes</b>	
D - Glucosa	1.100,0
Hipoxantina (Sal Na)	4,68
Ácido Lipoico	0,2
Rojo de Fenol	1,2
Piruvato de Na.	110,0
Timidina	0,7
<b>AMINOÁCIDOS</b>	
L - Alanina	9,0
L - Arginina - HCl	211,0
L - Aspargina - H <sub>2</sub> O	15,01
L - Ácido aspártico	13,0
L - Cisteina	25,0
L - Ácido glutámico	14,0

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (mg/ml)
L - Glutamina	146,0
Glicina	7,51
L - Histidina-HCl-H <sub>2</sub> O	23,0
L - Isoleucina	2,6
L - Leucina	13,0
L - Lisina - HCl	29,0
L - Metionina	4,48
L - Fenilalanina	5,0
L - Prolina	11,5
L - Serina	10,5
L - Treonina	3,57
L - Triptófano	0,6
L - Tirosina (sal Na <sub>2</sub> )	2,62
L - Valina	3,5
<b>VITAMINAS</b>	
Biotina	0,024
D-Ca-Pantotenato	0,715
Colina - HCl	0,698
Ácido Fólico	1,320
i - Inositol	0,541
Niacinamida	0,615
Piridoxina - HCl	0,206
Riboflavina	0,376
Tiamina - HCl	1,000
Vitamina B12	1,360

## Agregados:

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
HCO <sub>3</sub> Na	1,2 g/l
Penicilina	0,008 g/l
Estreptomicina	0,008 g/l
Lactato de Na.	4 ml

## Anexo 2

### CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS DE SEMEN

PARÁMETROS	DONANTES										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Espermatozoides (millones x ml)	62	126	77	80	150	140	72	96	84	100	91
d / 0.3 ml	19	38	23	24	45	42	22	29	25	30	27
Movilidad % A + B*	73	85	79	58	86	80	57	56	49	82	65
A + B / 0.3 ml	14	31	19	14	39	34	12	25	12	25	18
% Normales	79	72	60	70	77	71	55	69	80	72	65

\* = A + B (Rápidos más Lentos)

### Anexo 3

## PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS A LAS 2 HORAS DE INCUBACIÓN

MUESTRAS		TIPOS DE MEDIOS					
		M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
1	Nº	9	11	10	9	9	9
	%	64,2	78,5	71,4	64,2	64,2	64,2
2	Nº	14	17	10	14	11	11
	%	45,1	54,8	32,2	45,1	35,4	35,4
3	Nº	13	14	13	14	13	14
	%	68,4	73,6	68,4	73,6	68,4	73,6
4	Nº	11	14	13	12	13	13
	%	78,5	90,0	92,8	85,7	92,8	92,8
5	Nº	15	26	19	13	17	16
	%	39,4	68,4	50,0	34,2	44,7	42,1
6	Nº	29	31	19	24	22	22
	%	87,8	93,9	57,5	72,7	66,6	66,6
7	Nº	7	8	10	8	8	9
	%	58,3	66,6	83,3	66,6	66,6	75,0
8	Nº	15	16	14	12	12	15
	%	60,0	64,0	56,0	48,0	48,0	60,0
9	Nº	9	9	10	8	8	9
	%	75,0	75,0	83,3	66,6	66,6	75,0
10	Nº	12	15	16	15	16	14
	%	48,0	60,0	64,0	60,0	64,0	56,0
11	Nº	15	17	17	15	15	17
	%	83,3	94,4	94,4	83,3	83,3	94,4

Nº = Número de espermatozoides recuperados (millones por mililitro).

### Anexo 4

## PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS A LAS 4 HORAS DE INCUBACIÓN

MUESTRAS		TIPOS DE MEDIOS					
		M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
1	Nº	8	11	8	9	9	9
	%	57,1	78,5	57,1	64,2	64,2	64,2
2	Nº	16	15	10	10	9	13
	%	51,6	48,3	32,2	32,2	29,0	41,9
3	Nº	13	13	14	12	12	14
	%	68,4	68,4	73,6	63,1	63,1	73,6
4	Nº	11	13	13	12	11	11
	%	78,5	92,8	92,8	85,7	78,5	78,5
5	Nº	12	22	14	12	15	14
	%	31,5	57,8	36,8	31,5	39,4	36,8
6	Nº	18	25	18	20	21	20
	%	54,5	75,7	54,5	60,6	63,6	60,6
7	Nº	7	9	7	8	6	9
	%	58,3	75,0	58,3	66,6	50,0	75,0
8	Nº	12	14	12	11	12	13
	%	48,0	56,0	48,0	44,0	48,0	52,0
9	Nº	8	9	8	7	7	9
	%	66,6	75,0	66,6	58,3	58,3	75,0
10	Nº	11	13	14	14	13	12
	%	44,0	52,0	56,0	56,0	52,0	48,0
11	Nº	13	16	17	15	14	15
	%	72,2	90,0	94,4	83,3	77,7	83,3

Nº = Número de espermatozoides recuperados (millones por mililitro).

## Anexo 5

### PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS A LAS 6 HORAS DE INCUBACIÓN

MUESTRAS		TIPOS DE MEDIOS					
		M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
1	Nº	8	10	7	8	7	9
	%	57,1	71,4	50,0	57,1	50,0	64,2
2	Nº	14	15	7	10	10	8
	%	45,1	48,3	22,5	32,2	32,2	25,8
3	Nº	10	11	11	8	12	10
	%	52,6	57,8	57,8	42,1	63,1	52,6
4	Nº	10	13	12	11	12	11
	%	71,4	92,8	85,7	78,5	85,7	78,5
5	Nº	13	18	10	12	13	11
	%	34,2	47,3	26,3	31,5	34,2	28,9
6	Nº	16	19	17	14	18	14
	%	48,4	57,5	51,5	42,4	54,5	42,4
7	Nº	6	8	7	8	6	7
	%	50,0	66,6	58,3	66,6	50,0	58,3
8	Nº	11	13	11	11	11	12
	%	44,0	52,0	44,0	44,0	44,0	48,0
9	Nº	7	8	7	6	7	7
	%	58,3	66,6	58,3	50,0	58,3	58,3
10	Nº	8	11	14	11	11	11
	%	32,0	44,0	56,0	44,0	44,0	44,0
11	Nº	16	111	15	12	13	9
	%	90,0	61,1	83,3	66,6	72,2	50,0

Nº = Número de espermatozoides recuperados (millones por mililitro).

**Anexo 6**

**PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS A LAS 8 HORAS DE INCUBACIÓN**

MUESTRAS		TIPOS DE MEDIOS					
		M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
1	Nº	7	11	11	7	9	9
	%	50,0	78,5	78,5	50,0	64,2	64,2
2	Nº	10	13	9	10	8	8
	%	32,2	41,9	29,0	32,2	25,8	25,8
3	Nº	12	12	9	9	11	10
	%	63,1	65,7	61,7	56,5	63,1	63,1
4	Nº	10	12	12	10	10	7
	%	71,4	85,7	85,7	71,4	71,4	50,0
5	Nº	11	18	10	10	10	11
	%	28,9	47,3	26,3	26,3	26,3	28,9
6	Nº	13	19	11	13	12	14
	%	39,3	57,5	33,3	39,3	36,3	42,4
7	Nº	6	8	7	7	7	10
	%	50,0	66,6	58,3	58,3	58,3	83,3
8	Nº	11	11	9	9	9	11
	%	4,0	44,0	36,0	36,0	36,0	44,0
9	Nº	7	7	6	6	6	6
	%	58,3	58,3	50,0	50,0	50,0	50,0
10	Nº	7	11	12	11	9	10
	%	28,0	44,0	48,0	44,0	36,0	40,0
11	Nº	11	8	12	9	10	10
	%	61,1	44,4	66,6	50,0	55,5	55,5

Nº = Número de espermatozoides recuperados (millones por mililitro).

## BIBLIOGRAFÍA

1. JONES, R.E. Medical Aspects of Human Reproduction: Infertility. In: Human Reproductive Biology. R.E. Jones De. Academic Press, Inc. 1991:355-367.
2. IRITANI A. Current status of biotechnological studies in mammalian reproduction. *Fertil Steril* 50:543-551, 1988.
3. ALLEN, N.C; HERBERT, C.M; WAYNE, S.M; ROGER B.J; DIAMOND M.P; WENTZ, A.C. Intrauterine insemination: a critical review. *Fertil Steril*, 44:569-580, 1985.
4. UZCÁTEGUI C.L; BELLABARBA, G; BISHOP R; UZCÁTEGUI, C. Inseminación intrauterina con semen capacitado. *Rev. Obst. Gin. Venezuela* 52:109-115, 1991.
5. SHER, G; KNUTZEN, V.K; STRATTON C.J.; MONTAKHAH M.M; ALLENSON S.G. In vitro sperm capacitation and transcervical intrauterine insemination for the treatment of refractory. *Fertil Steril* 41:260-264, 1984.
6. STEPTOE, P.C; EDWARDS, R.G. Birth after implantation of a human embryo. *Lancet* 2:366-369, 1978.
7. ASCH, R.H; ELLSWORTH, L.R; BALMACEDA, J.P; WONG, P.C. Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer (GIFT). *Lancet* 2:1034-1039, 1984.
8. GORDON, J.W; GRUNFELD, L; GARRISI, G.J. Fertilization of human oocytes by sperm from infertile males after zona pellucida drilling. *Fertil Steril* 50:68-73, 1988.
9. GORDTS, S; GARCÍA, G; VERCRUYSEN, M; ROZIER, P; CAMPO, R; SWINNEN, K. Subzonal insemination: a prospective randomized study in patients with abnormal sperm morphology. *Fertil Steril* 60:307-313, 1993.
10. LANZENDORF, S.S; MALONEY, M.K; VEECK, L.L; HODGEN, G.D; ROZENWAKS, Z. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril* 49:835-842, 1988.
11. OLDS-CLARKE, P. Motility characteristics of sperm from the uterus and oviducts of female mice after mating to congenic males differing in sperm transport and fertility. *Biol. Reprod* 34:453-467, 1986.
12. DRESDNER, R.D; KATZ, D.F. Relationship of mammalian sperm motility and morphology to hydrodynamic aspects of cell function. *Biol. Reprod.* 25:920-930, 1981.
13. NAGAE, T; YANAGIMACHI, R; SRIVASTAVA, P.N; YANAGIMACHI, Y. Acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil Steril* 45:701-707, 1986.
14. BYRD, W; WOLFF, D.P. Acrosomal status in fresh and capacitated human ejaculated sperm. *Biol. Reprod.*, 34:859-869, 1986.
15. PLACHOT, M; MANDELBAUM, J; JUNCA, A.M. Acrosome reaction of human sperm used for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 42:418-423, 1984.
16. BEDFORD, J.M. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol. Reprod.* 28:108-120, 1983.
17. McMASTER, M; YANAGIMACHI, R; LOPATA, A. Penetration of human spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 19:212-216, 1978.
18. AKERLOF, E; FREDICSON, B; GUSTAFSON, O; LUNELL, N.O; NYLUND, L; ROSEMBORG, L; SLOTTE, H; POUSETTE, A. Sperm factors stimulate the motility of human spermatozoa. *Inter J Androl*, 12:124-130, 1989.
19. JARVI, K; ROBERTS, K.D; LANGLAIS J; GAGNON, C. Effect of platelet-activating factor, lysoplatelet-activating factor, and lysophosphatidylcholine on sperm motion: importance of albumin for motility stimulation. *Fertil Steril* 59:1266-1275, 1993.
20. AITKEN J.R; WANG, Y.F; LIU, J; BEST, F; RICHARDSON D.W. The influence of medium composition, osmolarity and albumin content on the acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa: development of an improved zona-free haster egg penetration test. *Int J Androl*, 6:180-193, 1983.
21. MAKLER, A; MAKLER, E; ITZKOVITZ, J; BRANDES, J.M. Factors affecting sperm motility. Incubation of human semen with caffeine, kallikrein, and other metabolically active compounds. *Fertil Steril* 33:624-630, 1980.
22. ROGERS, B.J; PERREAULT, S.D. Importance of glycolysable substrates for in vitro capacitation of human spermatozoa. *Biol. Reprod* 43:1064-1069, 1990.
23. PILIKIAN, S; ADELEINE, P; CZYBA, J.C; ECOCHARD, R; GUERIN, J.F; MIMOUNI, P. Hyperactivated motility of sperm from fertile donors and asthenozoospermic patients before and after treatment with ionophore. *Inter J Androl* 14:167-173, 1991.
24. LAMIRANDE, E; GAGNON, C. Quantitative Assessment of serum-induced stimulation of human sperm motility. *Inter J Androl* 14:11-22, 1991.
25. ZIEGER, D; CEDARS, M.I; HAMILTON, F; MORENO, T; MELDRUM, D.R. Factors influencing maintenance of sperm motility during in vitro processing. *Fertil Steril* 48:816-820, 1987.
26. GIANAROLI, L; SERACCHIOLI, R; FERRARETTI, A; TROUNSON, A; FLAMIÑI, C;

- BOVICELLI, L. The succesful use of human amniotic fluid for mouse embryo culture and human in vitro fertilization, embryo culture, and transfer. *Fertil Steril* 46:907-913, 1986.
27. CHAO, H.T; TSAI, K.L; HONG, C.Y; WEI, Y.H. Human follicular fluid stimulates motility and velocity of washed human sperm in vitro. *Andrologia* 24:47-51, 1992.
  28. TARLATZIS, B.C; DANGLIS, J; KOLIBIANAKIS, E.M; PAPADIMAS J; BONTIS, J; LAGOS, S; MANTALENAKIS, S. Effect of follicular fluid on sperm movement characteristics. *Arch Androl* 31:167-175, 1993.
  29. MENDOZA, C; TESARIK, J. Effect of follicular fluid on sperm movement characteristics. *Fertil Steril* 54:1135-1139, 1990.
  30. BLUMENFELD, Z; NAHHAS, F. Pretreatment of sperm with human follicular fluid for boderline male infertility. *Fertil Steril* 51:863-867, 1989..
  31. World Health Organization. WHO. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Third Edition: Cambridge University Press, Cambridge, England, 1992.
  32. LOPATA, A; PATULLO, J.M; CHANG, A; JAMES, B. A method for collecting motile spermatozoa from human semen. *Fertil Steril* 27:677-684, 1976.
  33. MAKLER, A; MURILLO, O; HUZSAE, G; TARLATZIS, B; DeCHERNEY, A; NAFTOLIN, F. Improved techniques for collecting motile spermatozoa from human semen. *Inter J Androl* 7:61-70.
  34. SCOTT, R; OEHNINGER, S; MENKVELD, R; VEEK, L; ACOSTA, A. Critical assessment of sperm morphology before and after double wash swim up preparation for in vitro fertilization. *Arch Androl* 23:125-129, 1989.
  35. VOGLMARYR, J.K. The effect of testosterone and related steroids on the oxidative and glycolytic activity and on lipid syntesis of testicular and ejaculated bull spermatozoa. *Acta Endocr* 68:793-804, 1971.
  36. WESTER, R.C; SALISBURY, G.W. Effect of testosterone, estradiol - 17B and progesterone on the oxygen ultake by bovine semen, washed spermatozoa. *Biol. Reprod* 7:25-30, 1972.
  37. HAMMERSTEDT, R.H; AMANN, R.P. Effects of physiological levels of exogenous steroids on metabolism of testicular, cauda epididymal and ejaculated bovine sperm. *Biol. Reprod.* 15:678-685, 1976.
  38. BECK, K.J; HERSCHEL, S; HUNGERSHOFER, R; SCHIWGER, E. The effect of steroid hormones on motility and selective migration of X and Y bearing human spermatozoa. *Fertil Steril*, 27:407-411, 1975.
  39. HYNE, H.V; BOETTCHER, B. Binding of steroids to human spermatozoa and its possible rol in conception. *Fertil Steril* 30:322-326, 1978.
  40. KESSERU, E; CAMACHO-ORTEGA, P; LAUDAHN, G; SCHOPFLIN, G. In vitro action of progestagens on sperm migration in human cervical mucus. *Fertil Steril* 26:57-60, 1975.
  41. CHEN, C; BOETTCHER, B. The effect of steroids on the in vitro migration of washed human spermatozoa in modified tyrod's solution or in fasting human blood serum. *Fertil Steril* 32:566-570, 1979.
  42. KREINER, D; LIU, H; ITSKOVITZ, J; VEECK, L; ROSENWAKS, Z. Follicular fluid estradiol and progesterone are markers of preovulatory oocyte quality. *Fertil Steril* 48:991-996, 1987.
  43. FORESTA, C; ROSSATO, M; Di VIRGILIO, F. Ion fluxes throug the progesterone-activated channel of the sperm membrane. *Biochem J* 279-283, 1993.
  44. SCHIMIZU, Y; NORD, P.E; BRONSON, R.A. Progesterone-evoked increases in sperm (Ca<sup>2+</sup>) correlate with the egg penetrating ability of sperm from fertile but not infertile men. *Fertil Steril* 60:526-530, 1993.
  45. TESARIK, J; MENDOZA, C. Defective function of a nongenomic progesterone receptor as a sole sperm anomaly in fertile patients. *Fertil Steril* 58: 793-797, 1992.

# El legado de Pasteur, y los inicios de la medicina científica en la Venezuela de finales del siglo XIX<sup>1</sup>

Vidal Rodríguez Lemoine, PhD  
Instituto de Biología Experimental (IBE)  
Facultad de Ciencias  
Universidad Central de Venezuela

## RESUMEN

En el presente trabajo se examinan algunos aspectos relativos a la presencia institucional de la doctrina de Pasteur en el medio académico nacional. Se discute el papel desempeñado por el Instituto Pasteur de Caracas, y su homólogo de Maracaibo en la enseñanza y práctica de la medicina en Venezuela hacia finales del siglo XIX, y principios del XX.

## ABSTRACT

Some aspects related to the institutional presence of Pasteur's doctrine in the Venezuelan academical media are examined. The role of the Institute Pasteur de Caracas and their homologous of Maracaibo is examined in relationship to training on medicine, and on the exercise of medicine at the end of the XIX century, and beginning of the XX.

Se han escrito innumerables trabajos —y no pocos tratados— sobre la enorme obra científica de Louis Pasteur, su aporte al conocimiento científico universal, y a la dilucidación del papel que juegan los microorganismos en el ciclo de transformación de la materia, incluyendo aquellos procesos que determinan patologías en humanos, animales y plan-

tas. Así, en esta materia es muy poco lo que puede agregar un modesto microbiólogo, que habita y trabaja en esta parte del mundo. Sin embargo, es de mucho interés —en particular para comprender los orígenes de nuestras instituciones científicas— examinar algunos aspectos relativos al proceso de incorporación de la doctrina de Pasteur y la influencia de su escuela, en la gradual transformación de la enseñanza y de la práctica de la medicina en nuestro medio. La oportunidad para tratar algunos aspectos de este tema nos la brinda los actos organizados para conmemorar cien años de la muerte de Pasteur.<sup>2</sup> Las ideas que presentamos en este trabajo forman parte de un estudio más amplio sobre los orígenes de la investigación biomédica en Venezuela.<sup>3</sup>

Ricardo Archila<sup>4</sup> —y otros destacados historiadores de la medicina en Venezuela— reconocen dos etapas claves en la evolución de los estudios médicos durante el siglo XIX e inicios del XX. La primera se refiere a la que tiene como punto de partida la reforma de la Facultad Médica de Caracas de 1827, conducida magistralmente por el académico y sabio José María Vargas, y la imagen tutelar del Libertador Simón Bolívar, quien la propició y le brindó todo su apoyo moral y político.<sup>5</sup> La segunda etapa —iniciada hacia la última década del siglo XIX y comienzos

1. Este trabajo está basado en una conferencia dictada en el acto conmemorativo del centenario de la muerte de Louis Pasteur, organizado por la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, Hotel Caracas Hilton, 18 de abril de 1995.
2. Pasteur dejó de existir en Villeneuve l'Etan, Marnes, a las cuatro y cuarenta minutos del sábado 28 de septiembre de 1895. La Sociedad Venezolana de Microbiología, y la Sociedad de Bioanalistas Especialistas declararon "Año conmemorativo del centenario de la muerte de Pasteur" desde noviembre de 1994 hasta noviembre de 1995, y organizaron un amplio programa de actividades.
3. Estudio sobre los orígenes de la investigación biomédica en Venezuela, con particular énfasis en la microbiología. V. Rodríguez Lemoine.

4. Archila, Ricardo. "Luis Razetti, o Biografía de la Superación". Imprenta Nacional, Caracas, 1952. Capítulo 2. El renacimiento de la medicina venezolana.
5. En la reforma universitaria de Vargas sobrevivieron muchas de las disposiciones pre republicanas, emanadas de la corona española, sin embargo, se introdujeron importantes innovaciones. La reforma consagró el principio de la autonomía universitaria, y asignó haciendas para garantizar su funcionamiento. Se eliminó el requisito de "limpieza de sangre" para el ingreso de alumnos, se crearon nuevas facultades y se renovaron profundamente las existentes. Los Estatutos de 1827 están publicados en el Tomo II, Decretos del Libertador (Sociedad Bolivariana de Venezuela, Caracas, Imprenta Nacional, 1961).

del XX— y a la cual nos referiremos en este trabajo, corresponde a los que se conoce en la historiografía médica venezolana como la de renovación de los estudios médicos.<sup>6</sup> Entre ambas hay un largo período donde privó el estancamiento, ya que los adelantos que se generaban en los centros más avanzados de Europa no llegaban, o llegaban tardíamente a nuestras costas, y cuando esto ocurría no encontraban tierra abonada para germinar.

Pasteur,<sup>7</sup> químico por formación, e investigador por naturaleza, no fue hombre ajeno al mundo de la medicina, aunque su trabajo no siempre fue bien recibido ni por el gremio médico, ni por muchos de los científicos de su época. Sin embargo, Pasteur se convirtió en el principal protagonista de un movimiento extraordinario —la revolución pasteuriana— que estremecería hasta sus raíces más profundas el empirismo dominante en la práctica médica, y colocaría a la medicina sobre bases más sólidas: las del conocimiento científico. Antes de la entrada de Pasteur en la escena del mundo de los microorganismos, era inmenso el desconocimiento que se tenía de los fenómenos de la fermentación y de las enfermedades contagiosas. Pero este hombre, de aguda inteligencia y extraordinaria perseverancia, se encargaría de descender, uno a uno, los velos que ocultaban las leyes de la naturaleza, logrando dilucidar el papel primordial de los seres microscópicos, desarrollar condiciones para aislar algunos gérmenes causantes de enfermedades, y transformar estos agentes destructores de la vida, en agentes capaces de preservarla. “Todos nosotros nos proclamamos discípulos de Pasteur”, diría el académico Brouardel<sup>8</sup> resumiendo el impacto de los descubrimientos de Pasteur y su escuela, aplicados al campo de la medicina. Luego añadiría, en el home-

naje que se le rendía al genio: “...más afortunado que Harvey y Jenner, habéis presenciado el triunfo de vuestras doctrinas. ¡Y qué triunfo el vuestro!... ¿No habéis indicado a los médicos los medios de preservar a las naciones de los flagelos más temibles? ¿No habéis salvado de la miseria, de las enfermedades y de la muerte a millares de seres humanos en los últimos diez años?”. El genio y la perseverancia del infatigable Pasteur lograron desterrar la doctrina de la generación espontánea, abriendo nuevos caminos a la ciencia.

Los discípulos de Pasteur, y sus seguidores en todo el mundo, se encargaron de propagar, no sólo en teoría sino en la práctica los principios de la doctrina pausteriana. Aplicaron sus enseñanzas, y emprendieron nuevos estudios, que condujeron a insospechados triunfos sobre el control de enfermedades que representaban el azote y la desesperanza de la humanidad entera. El anuncio de su más notable discípulo, Emile Roux,<sup>9</sup> sobre el tratamiento de la difteria con el suero antitóxico que “... conmovió a los habitantes de la tierra, que ante las noticias esperanzadoras aplaudió la nueva hazaña de la ciencia...”,<sup>10</sup> sólo comparable —en el campo de la salud— con la enorme repercusión que tuvo la aplicación exitosa del tratamiento contra la rabia desarrollado por el mismo Pasteur años antes.<sup>11</sup> Nuevos descubrimientos se sucederían uno tras otro. Yersin, otro de sus discípulos, logró —casi simultáneamente con su colega japonés Kitasato— identificar el bacilo de la peste bubónica (*Yersinia pestis*) en 1894. Descubierta el enemigo se abrigaba la esperanza de someterlo, como en efecto se hizo poco tiempo después. El conocimiento se difundió con relativa velocidad, y las esperanzadoras noticias traspasaron las fronteras del viejo continente.<sup>12</sup>

6. De acuerdo a Archila, los hechos más relevantes de ese período son: a) fundación del Hospital Vargas de Caracas (1891); b) creación de la Cátedra de Histología Normal y Patológica, Fisiología Experimental y Bacteriología (1891); c) fundación de la Sociedad de Médicos y Cirujanos de Caracas (1893); d) fundación de la Gaceta Médica de Caracas (1893); e) establecimiento de la enseñanza clínica en la Universidad Central (1895); f) fundación del Instituto Pasteur de Caracas (1895); g) establecimiento del concurso de internado y externado de los hospitales (1895); h) reforma de las cátedras de Anatomía y de Medicina Operatoria (1895-96); y) fundación del Colegio de Médicos de Venezuela (1902); j) fundación del Laboratorio del Hospital Vargas (1902), entre otras.

7. Se han publicado innumerables biografías sobre Louis Pasteur. Aquí hemos tomado como guía: “La vida de Pasteur” de Renato Vallery Rador. Editorial Juventud Argentina S.A. Buenos Aires. Sexta edición, 1952. Versión castellana de Jorge Degiorgi.

8. Palabras pronunciadas por el profesor Brouardel, Deca-

no de la Facultad de Medicina de París, durante el acto inaugural del Congreso Internacional de Higiene celebrado en París en 1889.

9. Roux, estrecho colaborador de Pasteur, comunicó sus resultados sobre la difteria en el Congreso de Higiene y Demografía celebrado en Budapest en 1894.

10. Parte del texto incluido en la campaña para recaudar fondos para la creación del Instituto Pasteur de Caracas. Encarte “El Cojo Ilustrado” Tomo IV, vol. 1, 1895.

11. Pasteur inició sus estudios sobre la rabia en 1884. Realizó la primera inoculación antirrábica en el hombre: el niño alsaciano José Meiste en julio de 1885.

12. En Venezuela le tocó a Rafael Rangel, entonces Director del Laboratorio del Hospital Vargas, establecer —en medio de una gran polémica— la presencia del bacilo de la peste durante la epidemia que hizo su aparición en el puerto de La Guaira en 1908.

A Caracas y Maracaibo llegó también la onda del sismo que transformaría la práctica de la medicina. Llegó no sólo a través de las noticias que, con la pesada carga, traían los vapores que cruzaban el Atlántico, sino a través de una renovadora generación de médicos que aunque formados en la vieja Facultad Médica de Caracas, había logrado —con recursos propios y apoyo del Estado— entrar en contacto directo con las nuevas corrientes de la medicina moderna, completando su formación académica en las aulas y laboratorios de las más avanzadas universidades europeas. Para fines del siglo el campo estaba roturado y la tierra preparada para la siembra de nuevas y fecundas ideas. El primer contingente de jóvenes promesas que regresaba al país cargado de conocimientos, ideas y proyectos, formó la nueva élite médica, a la que le tocará reiniciar el proceso de transformación de la medicina nacional. Entre ellos se destacaron Luis Razetti (1862-1932), José Gregorio Hernández (1864-1919), Francisco Antonio Rísquez (1856-1941), Pablo Acosta Ortiz (1864-1914) Santos Aníbal Dominici (1869-1954), Elías Rodríguez, hijo (1818-1895) Enrique Meier Flégel (1877-1927), en Caracas, y Manuel Dagnino, Rafael López Baralt (1852-1918) y Helí-

menes Finol (1852-1905), en Maracaibo. Ellos serán los protagonistas de un período caracterizado por una gran actividad en el campo médico. Les tocó actuar, y poner en práctica sus conocimientos en las salas del recién fundado Hospital Vargas de Caracas,<sup>13</sup> crear nuevas cátedras en la Universidad Central<sup>14</sup> y en el Zulia.<sup>15</sup> Fueron los responsables de la fundación de sociedades científicas como la Sociedad de Médicos y Cirujanos de Caracas (1893), de nuevas revistas científicas,<sup>16</sup> y de institutos para el estudio de la microbiología y sus aplicaciones en medicina, tanto en Caracas (1895),<sup>17</sup> como en Maracaibo (1896).<sup>18</sup>

El entusiasmo local por los nuevos aportes de la ciencia al progreso de la medicina se encuentra claramente reflejado en las noticias y artículos publicados en la prensa, o en revistas de la capital. En la edición de la prestigiosa revista "El Cojo Ilustrado" de mayo de 1897 leemos<sup>19</sup> "...parecen existir períodos destinados a ver derrumbarse en poco tiempo el viejo edificio de los conocimientos adquiridos; momentos esos como de bruscas renovaciones, que abren otros rumbos al espíritu, disipan de improviso las sombras que ocultaban la verdad, y permiten vislumbrar nuevos horizontes,..." Hemos querido hablar

13. El Hospital Vargas de Caracas fue decretado por el Presidente Dr. Juan Pablo Rojas Paúl, el 16 de agosto de 1888, e inaugurado el 1 de enero de 1891 por el Presidente Dr. Raimundo Andueza Palacios. Entró en funcionamiento el 5 de julio de 1891. Datos tomados de la Biografía del Hospital Vargas, Oscar Beaujon.

14. Cátedra de Histología Normal y Patológica, Fisiología Experimental y bacteriología (1891) a cargo de José Gregorio Hernández; Cátedra de Clínica Médica a cargo de S.A. Dominici; reforma de las cátedras de Anatomía y Medicina Operatoria.

15. En mayo de 1894, el Gobierno Regional decreta la creación de la Cátedra de Clínicas en los Hospitales de Maracaibo, con sede en el Hospital de Chiquinquirá. Manuel Dagnino es designado profesor, y el 5 de julio dicta la clase inaugural. Tomado de Roche id.

16. Iniciativa de Razetti y Dominici fue la fundación del Colegio de Médicos y Cirujanos de Caracas y de su órgano de difusión, la Gaceta Médica de Caracas. La proposición fue hecha en la reunión promovida por F.A. Rísquez y Razetti, realizada el 13 de marzo de 1893 en una sala de la Universidad Central. Como Director de la nueva sociedad fue nombrado Rísquez, Secretario J. de D. Villegas. Como Director y Administrador de la revista se designó a Razetti, quien la dirigió durante 31 años. En 1924 se exilia voluntariamente en Curazao, y Domingo Luciani se ocupa de la revista. En Maracaibo se fundó la Revista Clínico-Médica-Qurúrgica.

17. El Instituto Pasteur de Caracas fue fundado como una sociedad civil el 1º de abril de 1895, por iniciativa de S.

A. Dominici, quien fue su promotor y único director científico. Lo acompañaron en el proyecto Enrique Meier Flégel, Elías Rodríguez, Nicanor Guardia h., y Pablo Acosta Ortiz. Funcionó en la casa No. 103, entre las esquinas de Cruz Verde a Santa Rosalía, hasta poco tiempo después del exilio político de Dominici en 1902.

18. El Instituto Pasteur de Maracaibo fue fundado en 1896 por la Secretaría del Gobierno del Estado Zulia. Contaba con dos secciones: Bacteriología y Seroterapia a cargo de los doctores Helímenes Finol y Rafael López Baralt respectivamente, ambos con estudios de especialización en Francia. Aunque tuvo una vida corta, cumplió funciones de investigación, docencia y asistencia social que sirvieron como elementos renovadores de la medicina en el Zulia. Datos tomados del artículo de María Estela H. de Portillo "El Instituto Pasteur de Maracaibo" en Las Instituciones Científicas en la Historia de la Ciencia en Venezuela. H. Vesuri, compiladora. Fondo Editorial Acta Científica Venezolana, 1987.

19. Extractos de un artículo firmado por P. Acosta Ortiz, publicado en El Cojo Ilustrado, año VI, número 129, de fecha 1 de mayo de 1897. El artículo fue escrito a propósito de comentario sobre los Congresos Médicos Panamericanos celebrados, el primero en Washington, 1893, y el segundo en México en 1896, al cual asistieron por Venezuela P. Acosta Ortiz, Nicanor Guardia h. y Eduardo Andrade Penny. Señala Ortiz que la mayor parte de los estudios leídos fueron elaborados en el Hospital Vargas y en el Instituto Pasteur de Caracas. Venezuela obtuvo la sede para la realización del tercer Congreso en 1911, centenario de la Independencia, pero éste no se realizó en Caracas.

de la doctrina microbiana, de la obra inmortal de Pasteur; y si es verdad que la naturaleza y modo de obrar de los virus, y la idea de asimilarles a los fermentos, habían sido bosquejados de antiguo, es también indiscutible que se debe al genio fecundo de aquel sabio eminente el haber establecido sobre bases inmovibles la teoría de la infección, viéndose de completar su labor al mostrar, la morfología, condiciones biológicas y otros atributos de distintos gérmenes seguido esto del descubrimiento de otros microorganismos por Koch, Loeffler. ...Así es como los esfuerzos del trabajador ilustre han hecho participar a la Medicina científica del impulso vigoroso de este siglo, ... Lanzada así la Ciencia por nuevos derroteros, hubieron de surgir necesidades de otro orden, los medios de investigación se multiplicaron, complicándose; y desde el Clínico profundo que espera ver salir la última palabra del problema de la probeta del químico, de la preparación microscópica o del ensayo del sabio experimentador, hasta el modesto práctico que cree encontrar en la última revista los recursos terapéuticos que le faltan..., ven envejecerse día por día los pesados volúmenes de la obra enciclopédica en el fondo de los anaqueles de su biblioteca".

El campo de la medicina se ensancha y se consolidan sus bases con la ayuda del laboratorio y de la experimentación científica. Y como un medio para sustentar ese extraordinario cambio irá surgiendo la necesidad de crear institutos dedicados a estudiar y aplicar los nuevos métodos, y los recursos que entraron a formar parte esencial de la nueva medicina. El Instituto Pasteur de París, fundado en 1888,<sup>20</sup> se convirtió gracias a su febril y exitosa actividad, en el epicentro de un movimiento renovador, cuya influencia se hizo sentir en los más recónditos lugares del planeta. Surgieron institutos con idénticos propósitos —y la más de las veces con el nombre del ilustre sabio— en casi todas las capitales de Europa, Asia y en diferentes países del continente Americano.

La fundación de un Instituto "...a semejanza del que existe en París",<sup>21</sup> en la Caracas aldeana de finales de siglo, con una universidad anquilosada, sin tradición científica, y refractaria a todo lo que pudiera significar cambio, constituye un hecho sin-

gular en la historia social y política de la Venezuela. Esta iniciativa —reflejo de lo que estaba ocurriendo en los centros más avanzados— revela un intento para incorporar la medicina local dentro de las corrientes más avanzadas del pensamiento científico universal.<sup>22</sup> En palabras de sus proponentes<sup>23</sup> "... El Instituto, que debe llevar el nombre del sabio más eminente de este siglo, serviría también para la producción y conservación de la vacuna antirrábica, que ya hace años debería estar aquí donde más de una vez hemos visto sucumbir desgraciados hidrófobos en presencia del médico, que se cruza de brazos por no tener a su alcance nada de lo que hoy brinda la ciencia; serviría para tener siempre a nuestra disposición, fresca y directa de la ternera y por consiguiente con toda garantía, la vacuna contra la viruela; y para seguir en Caracas los estudios llenos de promesas —de los sueros antitetánico, que ya se ha empezado a aplicar en Europa—, anti-neumónico, antitifoideo, etc. No podemos detenernos por más tiempo en enumerar los muchos otros beneficios que derramaría el Instituto; queremos, sin embargo hacer hincapié sobre los que se refieren a la cría y a la agricultura, magnas fuentes de nuestra riqueza territorial: ciertas enfermedades desconocidas que diezman por épocas nuestro ganado vacuno y caballar, podrían, sometidas a todos los medios modernos de estudio, encontrar un remedio poderoso, como ha pasado en Francia con las del ganado lanar, e idéntica reflexión puede hacerse sobre las que arruinan nuestras sementeras. La medicina nacional, en fin, recibiría un empuje saludable; y de la aplicación científica de los métodos al estudio de las fiebres que nos azotan, de la disentería, de la lepra, etc., no puede resultar sino un tratamiento más y más eficaz y una economía de vidas inapreciable".

Los fundadores del Instituto Pasteur de Caracas tomaron como modelo, e intentaron reproducir —aunque en modesta escala— al prestigioso Instituto Pasteur de París, fundado en 1888, mediante suscripción internacional, y el apoyo del Estado francés. Al joven médico venezolano Santos Aníbal Dominici debemos el sueño, y la realización de esta utopía. Dominici, graduado en la Universidad Central (1890), completó sus estudios y se doctoró en la

20 En 1886 la Academia de Ciencias creó un establecimiento antirrábico que llevaría el nombre de Instituto Pasteur de París. Para tal fin se abrieron suscripciones públicas en Francia y en el extranjero, cuyos fondos depositados en el Banco de Francia serían administrados por una junta de patronato. Fueron enormes las donaciones provenientes de todo el mundo. En 1888 se inauguró la primera edificación del actual Instituto Pasteur.

21. Dominici al ministro de Instrucción Pública.

22. Datos tomados, y texto inspirado en el libro de Marcel Roche "Rafael Rangel ciencia y política en la Venezuela de principios de siglo", Monte Avila Editores 197.

23. Parte del texto publicado bajo el título de: "Campaña abierta para 1895. INSTITUTO PASTEUR" como encarte en el Tomo 4º de la Revista "El Cojo Ilustrado" del 1º de enero de 1895.

Universidad de París (1894). A su regreso ejerció la medicina clínica, y fundó la cátedra correspondiente en la Universidad. Instaló el primer laboratorio privado de microscopía clínica al servicio del gremio médico. En ese laboratorio inició actividades de investigación que conducirían, más adelante, a la identificación —por primera vez en Venezuela— del hematozoario de Laveran (*Plasmodium falciparum*), agente causal del paludismo. Esta corta experiencia sirvió como elemento de motivación para proponer la creación en la capital de una institución —de carácter privado— que sirviera de apoyo a la práctica médica. La participación de la empresa privada, de la recién fundada Cámara de Comercio de Caracas, y de particulares que actuaron a título personal fue decisiva en la creación de la novedosa institución que tendría una enorme influencia en la enseñanza y práctica de la medicina en nuestro medio.<sup>24</sup> Después de una corta pero exitosa campaña de promoción en la Revista "El Cojo Ilustrado" se reunieron los fondos para iniciar el proyecto,<sup>25</sup> y el 1º de abril de 1895 quedó formalmente instalado el Instituto Pasteur de Caracas, cuyos objetivos, de acuerdo a declaraciones de los fundadores<sup>26</sup> serían:

1. El de las investigaciones puramente científicas, con el objeto de esclarecer muchos puntos oscuros peculiares a nuestra patología, no sólo humana, sino también la de la serie animal que pueda interesarnos, y aun la vegetal.
2. El de seguir todos los adelantos de la Seroterapia y de la Opoterapia que tanto auge alcanzan en el mundo científico, y el de aplicarlos en la República.
3. El de producir la vacuna animal en cantidad sufi-

ciente para propagarla en toda la República.

4. El de poner a la disposición de los médicos los medios últimos de laboratorio que faciliten el diagnóstico y fijar el tratamiento.
5. El de enseñar la Microbiología y sus diversos ramos.

El Instituto —el primero en su género en Venezuela— cumplió, hasta su temprana desaparición en 1902, con buena parte de los objetivos propuestos. El proyecto dio inicio a un amplio programa de investigación sobre enfermedades propias de nuestro medio;<sup>27</sup> contribuyó a la formación de recursos humanos en el área de la bacteriología y parasitología,<sup>28</sup> y brindó ayuda al gremio médico en el diagnóstico clínico.<sup>29</sup> A estas actividades se sumaron la producción de la vacuna antivariólica, y su aplicación en todo el territorio nacional.<sup>30</sup> No fue sólo a través del nombre, sino de los proyectos, y de las actividades que se realizaron en el instituto, que se hizo sentir su contribución a la divulgación de la doctrina pasteuriana en nuestro medio.<sup>31</sup>

Dominici tuvo clara conciencia de las dificultades que existían para incorporar la investigación científica, y su aplicación en nuestro medio, de allí que se empeñara en dar a conocer por todos los medios posibles las actividades del recién creado Instituto.<sup>32</sup> A pesar de la inestabilidad política, y de la difícil situación económica que atravesaba el país, el Instituto fue reconocido, y recibió el apoyo financiero del gobierno. La administración del General Joaquín Crespo (1892-1897), declaró al Instituto "de utilidad pública", y le asignó algunas partidas del presupuesto. Al poco tiempo decretó "creación en Caracas de

24. Para ese momento ya J.G. Hernández había fundado (6 de noviembre de 1891) la Cátedra de Histología Normal y Patológica, Fisiología Experimental y Bacteriología.

25. La Empresa El Cojo, y la Cámara de Comercio aportaron Bs. 3.000. Por suscripción publicitada en El Cojo Ilustrado se recaudaron más de 2.000 pesos.

26. Los objetivos del Instituto aparecen en una cita incluida por Rodríguez Rivero en su libro "Epidemias y Sanidad en Venezuela" (1924) Tipografía Mercantil, Caracas.

27. Los estudios sobre el paludismo los inició Dominici en el Laboratorio de Microscopía, antecesor del Instituto, en 1894. La descripción, por primera vez en Venezuela del Hematozoario de Laveran fue realizada, al menos en parte, cuando ya el Instituto había sido fundado.

28. Se realizaron los primeros cursos de bacteriología práctica. Algunas lecciones, dictadas por Dominici, fueron publicadas en la Gaceta Médica de Caracas.

29. Como un servicio auxiliar en el diagnóstico clínico se realizaban pruebas y exámenes de laboratorio: esputos, ori-

na, sangre, pus, falsas membranas, neoplasma. Datos tomados del informe publicado en "El Cojo Ilustrado" en enero de 1896.

30. Se reprodujo en terneras, libres de tuberculosis, la linfa vaccinal en cantidad suficiente para su distribución y aplicación en todos los Estados de la República. En 1898, cuando la epidemia de viruela azotó a la nación, iniciaron una campaña de vacunación gratuita en la sede del Instituto.

31. La enseñanza de la microbiología se impartía desde la cátedra, fundada en 1891 por José Gregorio Hernández, pero la enseñanza práctica de la microbiología, y el espíritu de indagación fue transmitido desde las modestas instalaciones del Pasteur. Rafael Rangel, quien se convertiría en el padre de la parasitología en Venezuela, recibió las primeras lecciones prácticas, y la orientación en los temas de investigación de Dominici, a quien consideraba su maestro intelectual.

32. Véase Rodríguez Lemoine, V. "El Instituto Pasteur de Caracas (1895-192) Boletín de la Sociedad Venezolana de Microbiología Vol 14, Nº 2 1994.

un establecimiento —oficial— denominado Instituto Pasteur<sup>33</sup> destinado al estudio de la microbiología en sus diversos ramos, y el de todas las aplicaciones de esta ciencia". Sin embargo, este decreto —como tantos otros que han sido promulgados a lo largo de nuestra historia republicana— no se concretó. Por el contrario, durante la epidemia de viruela de 1898 —que abarcó gran parte del territorio nacional— la respuesta del ejecutivo fue tratar de ejercer el control de las actividades del Instituto, disponiendo, mediante decreto presidencial, su pase al Ministerio de Instrucción Pública, y proponiendo —acto seguido— la creación de un Instituto Jenner,<sup>34</sup> "... dedicado —igual que el Pasteur— al estudio de la Microbiología en sus distintos ramos, y a la preparación de Sueros y demás líquidos orgánicos usados en medicina, principalmente la linfa vaccinal para proveer de ella a toda la nación". El nuevo Instituto quedaría bajo la inmediata inspección del Ministerio de Instrucción Pública. Pero, esta iniciativa del gobierno que surgió como contraposición al Instituto Pasteur no llegó a concretarse, ya que como ocurre con frecuencia en nuestro medio, una vez que la epidemia de viruela fue controlada —gracias a la aplicación del decreto que hizo obligatorio el sistema de vacunación y en buena medida a la aplicación sistemática de la linfa cosechada en las instalaciones del Instituto Pasteur— cesaron las presiones

que le dieron origen, y el gobierno de turno se encargaría de guardar cuidadosamente el proyecto en el rincón de algún Ministerio. Aparte de las motivaciones personales, o de carácter político circunstancial, que pudieron rodear esta crisis, se hizo evidente la confrontación entre los intereses de un Estado que manifestaba una fuerte vocación centralizadora, y las iniciativas —entonces incipientes— de la empresa privada emergente, basada en la doctrina económica liberal.

En Maracaibo, —el otro polo de desarrollo económico y cultural del país—, surgió, casi simultáneamente, el interés por el desarrollo de la bacteriología y sus logros sobre la medicina moderna. Así, a comienzos de 1896, Helímenes Finol, quien había realizado cursos de bacteriología en Francia, fundó un laboratorio de bacteriología, equipado con instrumentos adquiridos por él de París, al que llamó Laboratorio Pasteur. En agosto del mismo año se iniciaron las gestiones para crear "un instituto donde se pudieran realizar estudios bacteriológicos en la forma en que Louis Pasteur lo había hecho en Francia". El Instituto, en este caso dependiente completamente de la Gobernación del Estado Zulia, fue inaugurado oficialmente el 6 de febrero de 1897.<sup>35</sup> Helímenes Finol se encargaría de la sección de Bacteriología, y López Baralt de la de Seroterapia. Aunque tuvo una existencia efímera —funcionó proba-

33. El Decreto Presidencial, firmado por Joaquín Crespo de fecha 8 de febrero de 1897, consideró como motivaciones para la creación de un Instituto Pasteur —oficial— "Que los descubrimientos de Pasteur, por los progresos médicos e industriales a que ha contribuido, lo hacen merecedor del grato recuerdo de la humanidad; Que la creación de un Instituto donde se estudie la microbiología y sus métodos, es ya una necesidad en Venezuela, dados los adelantos alcanzados en esta ciencia por nuestros Profesores de Medicina, para nuevas investigaciones, y para la enseñanza de la juventud que a ella se dedica". El Instituto Pasteur de Caracas había sido fundado y funcionaba como sociedad civil, y contaba con subsidios ocasionales del Gobierno. En su articulado se establece que: "Para alojar el expresado instituto, se construirá un edificio, por cuenta del erario Nacional con capacidad, forma y distribución que su objeto requiere; "Por disposiciones especiales se dictarán todas las medidas conducentes a la construcción y habilitación del edificio, y a la organización del personal y servicio del instituto". Datos tomados de Rodríguez Rivero, "Epidemias y Sanidad en Venezuela".

34. El Instituto Jenner de Vacuna fue decretado el 10 de septiembre de 1898 por la administración del General Ignacio Andrade (1898-1899). Entre las argumentaciones incluidas en el decreto encontramos "... en vista que la Resolución Ejecutiva del Despacho de Relaciones Interiores del 26 de junio de 1898, se hizo obligatorio el sistema

de vacunación en todo el territorio de la República; y atento a que es indispensable poseer para el efecto la cantidad de linfa vaccínica suficiente y un instituto de carácter nacional y permanente que la produzca, dotado y atendido debidamente, ya que el instituto Pasteur es una Sociedad Civil formada por particulares como consta de comunicación oficial que ha dirigido su Director a este Ministerio y publicada en el periódico El Tiempo, ha tenido a bien disponer la creación de un Instituto Jenner, dedicado al estudio de la Microbiología". Y con fecha 17 de noviembre de 1898 se reglamenta al anterior Instituto, contemplándose entre sus propósitos los siguientes: a) Elaboración de linfa vaccinal; b) preparación de sueros antitetánicos, antidiftérico, antiestreptococos y antivenenosos y la inyección antirrábica; c) el estudio de la microbiología en sus diversas ramas; d) la vacunación gratis. Se fija el personal: Director, Preparador, y Sirviente. Lo firma: B. Mosquera (Ministro de Instrucción Pública).

35. El 25 de agosto de 1896, Rafael López Baralt y Manuel Dagnino se dirigieron al Gobernador del Estado para proponer la creación de un instituto destinado a los estudios bacteriológicos, y a la fabricación de sueros y vacunas. El Instituto funcionó en el local del Anfiteatro anatómico anexo al Hospital de la Chiquinquirá. Tanto la dotación instrumental, como el mantenimiento estuvieron a cargo de la Tesorería General de Rentas del Estado Zulia.

blemente hasta 1901— el Instituto desplegó actividades en investigación, docencia, y asistencia social.<sup>36</sup>

La existencia y el desarrollo de estas dos instituciones pioneras de la investigación en Bioanálisis estuvo siempre amenazada por los abruptos y frecuentes cambios de gobierno. El triunfo del General Cipriano Castro,<sup>37</sup> al frente de la revolución Liberal Restauradora, finalizando el siglo, introdujo cambios en la estructura del poder político. López Baralt pasó a ocupar cargos importantes en el gobierno central, separándose del Instituto, mientras que Finol, al frente de un movimiento regionalista, sería reducido a prisión en 1900. El Instituto Pasteur de Maracaibo desaparecerá a comienzos de siglo. Dominici, por otra parte, sería nombrado Rector de la Universidad Central de Venezuela, pero se vería obligado a renunciar a comienzos de 1901, alejándose del apoyo que había ganado del nuevo Presidente. A comienzos de 1902 estalla la revolución Libertadora contra el gobierno de Castro, encabezada por el general y banquero Manuel Antonio Matos, apoyado por intereses económicos europeos. Dominici que era partidario de los ideales de Matos tomó filas en el movimiento, siendo nombrado Médico Cirujano del Ejército Libertador, y al fracasar el movimiento armado emprende, junto a un nutrido grupo de la élite intelectual, el camino del exilio, para radicarse en Europa y los Estados Unidos y no regresar al país hasta 1936.<sup>38</sup> En ausencia de quien fue su promotor y único director científico, el Instituto comenzó a declinar hasta su cierre definitivo en 1902.

Durante su corta existencia el Instituto Pasteur de Caracas, y también el de Maracaibo dejaron

imborrable huella en el desarrollo de la biomedicina en Venezuela. Antes de la creación del Instituto Pasteur de Caracas no se cultivaba la microbiología como una ciencia, ni se hacía uso de sus aplicaciones. La enseñanza teórica se realizaba en la Cátedra fundada por J. G. Hernández. A través del Instituto se introdujo al país, con fines de diagnóstico, la primera colección completa de gérmenes conocidos, y se organizaron los primeros cursos de Bacteriología práctica. Algunas de las lecciones, dictadas por Dominici, fueron publicadas en la Gaceta Médica de Caracas,<sup>39</sup> contribuyendo a la formación del primer contingente de microbiólogos. Rafael Rangel fue uno de los primeros en participar y colaborar en esta actividad. En el campo de la producción de vacunas le toca el mérito de haber producido —a un año de su instalación— la linfa vaccinal por la inoculación del virus en terneras libres del bacilo de la tuberculosis.<sup>40</sup> En abril de 1897 inauguró un servicio gratuito de vacunación antivariólica, y durante la epidemia de viruela de 1898 produjo linfa en cantidad suficiente para su distribución y aplicación en casi todos los Estados de la República, contribuyendo enormemente a controlar el brote epidémico. Aunque —por falta de recursos— el suero antidiftérico de Roux no llegó a ser producido en el Instituto, lo importaba y aplicaba, a sólo cinco meses del inicio de su producción en París. Lograron cultivos puros del microbio del tétano (*Clostridium tetani*), prepararon la toxina tetánica, e iniciaron los trabajos para producir el suero.<sup>41</sup> En lo que se refiere a la difteria, lograron aislar bacilos puros de *Corynebacterium diphtheriae*.<sup>42</sup> Su contribución en el campo de la investigación biomédica propiamente dicha no fue

36. Texto inspirado", y notas tomadas del trabajo de María Estela Portillo "El Instituto Pasteur de Maracaibo" publicado en: Las Instituciones Científicas en la Historia de la Ciencia en Venezuela. Fondo Editorial Acta Científica Venezolana.

37. Cipriano Castro toma el poder al frente de la revolución Liberal Restauradora, en octubre de 1899, tras el derrocamiento del general Ignacio Andrade.

38. Dominici se exilia en Francia, luego es nombrado por el Gobierno encabezado por J. V. Gómez Ministro Plenipotenciario de Venezuela en Washington. Renunciará en 1924, cuando el dictador nombra a su hermano y a su hijo como Vicepresidentes de la República, argumentando que "Semejante elección para asombro de la América republicana es una demostración de un régimen dinástico". Se residencia en París, y desde allí apoyará al Libertador contra Gómez. Regresa en 1936, a la muerte del dictador, y es nombrado Ministro de Sanidad y Asistencia Social, dura sólo siete meses al frente del Ministerio.

39. Gaceta Médica de Caracas. Tomo IV Nros. 15, 16, 19 y 20 de 1896.

40. En comunicación dirigida a J. M. Herrera Irigoyen, fecha 14 de enero de 1896, y publicada en "El Cojo Ilustrado" dan cuenta de la producción, por primera vez en Venezuela de la vacuna antivariólica en terneras, en los siguientes términos: "Después de varias tentativas, logramos obtener dos pústulas en una ternera de seis meses de edad y en perfecto estado de salud; se recogió la linfa, para inocularla en otra ternera, obtener mayor cantidad de fluido vacuno y ponerlo a la disposición del público".

41. Es el primer reporte de cultivo de un organismo anaerobio en Venezuela.

42. No hay clara evidencia de este hecho. En la misma comunicación de la nota 40 reportan: "...hemos obtenido bacilos puros después de numerosos cultivos, aunque nos hemos tropezado con el inconveniente de no poder sostener la estufa a una temperatura constante por falta de presión de gas; así que no ha sido posible obtener todavía el suero antidiftérico. Aunque ya instalada la planta eléctrica del Encantado, la luz eléctrica llegará al centro mucho más tarde.

menos importante. Se destacan el inicio de los estudios de nuestra patología, entre ellas la anemia tropical, y la aplicación de los métodos curativos y preventivos modernos. De allí saldrán líneas de investigación como la que más adelante seguirá Rangel en el Laboratorio del Hospital Vargas.<sup>43</sup>

Podemos afirmar que los propósitos, servicios y realizaciones de los institutos Pasteur de Caracas y Maracaibo contribuyeron significativamente a cambiar la enseñanza y práctica de la medicina nacional. Estos institutos sirvieron de medio de vinculación, y de comunicación con las corrientes transformadoras de la medicina basada en el conocimiento científico. El Instituto Pasteur de Caracas fue la primera institución creada en la República que incluyó entre sus objetivos la realización de investigación "puramente científica", sobre problemas que afectaban la salud del venezolano, y que dio pruebas visibles de que tal actividad podía realizarse, a pesar de la ignorancia reinante en la población, de la resistencia de la academia al cambio, y de la movidiza situación política.

Como era predecible en un medio donde la fractura de las instituciones es la norma, y frente a tanta adversidad, no resultaría posible que la utopía se convirtiera en realidad irreversible. El cultivo de una actividad como la investigación científica, que no tenía antecedentes ni seguidores idóneos en el país demandaba —como demanda aún hoy— mayor atención. Es así que al separarse —por razones políticas— quienes gestaron estas noveles instituciones, quedaron a merced de sus detractores, quienes en funciones de gobierno, en lugar de consolidar su acción asignándole presupuestos adecuados y reforzando sus cuadros científicos, optaron por restarle importancia, negarle auxilio económico, y acelerar su desaparición, pero la necesidad de contar con instituciones como el Instituto Pasteur de Caracas había enraizado profundamente en nuestro medio académico. Las ideas, propósitos y experiencias

que dejó en su corta existencia fueron retomadas —una y otra vez— en propuestas y programas a lo largo del azaroso y lento proceso de modernización del país. El Laboratorio del Hospital Vargas, fundado antes de la total desaparición del instituto Pasteur, y dirigido por Rafael Rangel, discípulo de Hernández y Dominici fue heredero legítimo de ese primer intento de institucionalización. Más tarde los laboratorios que funcionaron en la Sanidad Nacional, que emergieron durante la dictadura de Juan Vicente Gómez, y el Instituto Nacional de Higiene, fundado poco tiempo después de la muerte del dictador, representan de alguna manera la natural continuidad de esa propuesta. Pero, ...¡cuánto esfuerzo y tiempo desperdiciados! Bien distinta sería la historia si en lugar de la tradicional postura de los políticos en el poder, que en creativo juego se recrean reinventando lo que ya ha sido inventado, dedicaran su esfuerzo a revisar críticamente —sin apasionamiento o clientelismo político— las instituciones y sus trayectorias, y le brindaran firme y decidido apoyo.

Los tiempos han cambiado. Hoy tenemos una pequeña pero robusta comunidad científica, y no pocas instituciones dedicadas al cultivo de diferentes disciplinas científicas, incluidas aquéllas que se iniciaron alrededor del Instituto Pasteur de Caracas. Pero, hoy como ayer, la estabilidad y continuidad de los programas de investigación y desarrollo, incluida la formación de recursos humanos está de nuevo en peligro. Necesitamos algo más que los exigüos presupuestos que tradicionalmente asignan los Ministerios de Sanidad y de Educación, y en general el Estado venezolano, a algunos centros de investigación ligados a los servicios de salud pública. Necesitamos reactivar, e iniciar nuevos programas de investigación básica y de aplicación dirigidos a la solución de problemas de salud propios de nuestro medio. No permitamos que se derrumbe lo que por tan difíciles caminos hemos logrado construir.

43. La Junta Administradora de los Hospitales fundó, por iniciativa y sugerencia de J. P. Tamayo, el Laboratorio del Hospital Vargas, el 1 de febrero de 1902. Rafael Rangel es nombrado Director el 18 de febrero del mismo año. Al comienzo contó con pocos equipos, pero rápidamente logra el apoyo del Presidente Castro —y en ausencia de otras instituciones de la misma naturaleza (el Instituto Pasteur estaba en vías de desaparecer)— se convertiría —gracias a la extraordinaria labor desplegada por

Rangel— en un centro no sólo de servicios para el Hospital, sino de investigación activa en el campo de la parasitología. Nunca antes en la historia un solo centro recibió tanta ayuda material del gobierno. Coincidimos con Roche cuando afirma que "...el Instituto Pasteur fue el directo precursor del Laboratorio del Hospital Vargas, y sin la menor duda, inspiró a Rangel en sus objetivos y la dirección general de sus investigaciones".

**BIBLIOGRAFÍA**

ARCHILA, Ricardo. (1965) Historia de la Sanidad en Venezuela. Tomo I. Imprenta Nacional, Caracas.

ARCHILA, Ricardo. Luis Razetti o biografía de la superación. (1952). Imprenta Nacional, Caracas.

ARCHILA, Ricardo. Instituto Pasteur de Caracas, en: Historia de la Medicina en Venezuela (1946). Ediciones del Rectorado, Caracas.

BRICEÑO IRAGORRY, Leopoldo. Instituto Pasteur de Caracas. Gaceta Médica de Caracas, Año LXXXVIII, julio-septiembre, 331-335 (1980).

El Cojo Ilustrado. Varios volúmenes (1895 a 1902).

Gaceta Médica de Caracas. Varios volúmenes (1895-1902).

PORTILLO de, María. (1989). El Instituto Pasteur de Maracaibo. En: Las Instituciones científicas en la historia de la ciencia en Venezuela. H. Vesuri, compiladora. Fondo Editorial Acta Científica Venezolana. Litopar C.A., Caracas.

ROCHE, Marcel. (1976) Rafael Rangel: Ciencia y política en la Venezuela de principios de siglo. Monte Avila Editores, Caracas.

RODRÍGUEZ LEMOINE, Vidal. (1988). De la Sanidad a la Ciudad Universitaria. Acta Científica Venezolana 39: 385-386.

RODRÍGUEZ LEMOINE, Vidal ( ) Cien años de microbiología en Venezuela. (Editorial) Acta Científica Venezolana.

RODRÍGUEZ LEMOINE, Vidal (1994). El Instituto Pasteur de Caracas (1895-1902). Boletín de la Sociedad Venezolana de Microbiología Vol. 14, N° 2 julio-diciembre 41-43.

RODRÍGUEZ RIVERO, Plácido Daniel. (1924). Epidemias y Sanidad en Venezuela. Tipografía Mercantil, Caracas.

RODRÍGUEZ RIVERO, Plácido Daniel. Historia Médica de Venezuela.

VALERY-RADOT. La vida de Pasteur. Editorial Juventud Argentina, S.A. Buenos Aires. Sexta Edición.

# LABORATORIO Y DIABETES MELLITUS

AUTORES:

1. MARIELA PAOLI DE VALERI

Médico endocrinólogo. Profesor asistente de la Universidad de Los Andes.  
Coordinadora del Postgrado de Endocrinología.

INSTITUCIÓN: Unidad de Endocrinología. Universidad de Los Andes.  
Hospital Universitario de Los Andes.

DIRECCIÓN: Unidad de Endocrinología. Hospital Universitario de Los Andes.  
Teléfonos: 074-711051; 014-741983. Fax: 074-911797.

2. GABRIELA ARATA DE BELLABARBA

Bioanalista. Maestría en Ciencias Básicas. Profesor Titular de la Universidad de Los Andes.  
Cátedra de Fisiopatología.

INSTITUCIÓN: Cátedra de Fisiopatología. Universidad de Los Andes.

## 1. DEFINICIÓN:

La diabetes mellitus define un grupo heterogéneo de desórdenes caracterizado por hiperglicemia crónica asociada a una acción insulínica inadecuada; aunque es definida en términos de elevación de los niveles de glucosa sanguínea, la falta de acción insulínica resulta en múltiples daños metabólicos, endocrinos y hematológicos, los cuales pueden ser importantes en la patogénesis de la enfermedad y sus complicaciones, pero que usualmente mejoran cuando se controlan los niveles de glucosa. Además, la diabetes mellitus tiene una marcada tendencia a desarrollar formas relativamente específicas de enfermedad renal, ocular, neurológica y cardiovascular. La frecuencia de la diabetes mellitus oscila entre el 3 y el 5% de la población<sup>(1,2)</sup>.

## 2. REGULACIÓN DE LA GLUCOSA SANGUÍNEA:

Cuando ingresa alimento a nuestro organismo, los carbohidratos son transformados por medio de las enzimas digestivas en glucosa, la cual es absorbida y utilizada por nuestros tejidos. La principal hormona secretada en esos momentos es la insulina, ya que ésta se encarga de facilitar la captación de glucosa, su utilización para la producción de energía y su depósito en forma de glucógeno, a nivel de los tejidos sensibles a su acción, principalmente hígado y músculo. Aproximadamente dos horas después de comer, este proceso ha culminado y los niveles de insulina disminuyen, mientras que los de

las hormonas contrarreguladoras, (glucagon, cortisol y catecolaminas) aumentan, con la finalidad de degradar el glucógeno almacenado y garantizar un nivel de glucosa sanguínea adecuado para la función del sistema nervioso central y en general de todos los tejidos del organismo, durante los estadios post-absortivos (2 horas postprandial hasta la próxima comida) y de ayuno (toda la noche). Otras acciones importantes de la insulina son un efecto anabólico, mediante el cual se favorece la captación de aminoácidos; un efecto lipogénico, evitando así la producción de ácidos grasos libres; y una inhibición de la cetogénesis, es decir, de la formación de cuerpos cetónicos. Las hormonas contrarreguladoras tienen los efectos contrarios.<sup>(3)</sup>

En la diabetes mellitus, la falta de acción insulínica y en consecuencia, el predominio de acción de las hormonas contrarreguladoras conduce a que la glucosa que ingresa con los alimentos no pueda ser utilizada, y a que la producción hepática de ella esté aumentada, de manera que la glucosa en sangre se eleva. Normalmente la glucosa es filtrada en su totalidad a nivel renal, pero igualmente es reabsorbida a nivel tubular por un mecanismo que es saturable. Cuando la cantidad de glucosa filtrada excede la capacidad de reabsorción tubular, aparece glucosuria, lo cual sucede cuando el nivel de glucosa sanguínea excede los 200 mg/dl. Dicha glucosuria conduce a diuresis osmótica, y en consecuencia, a pérdida elevada de agua y electrolitos, que, junto a otras alteraciones metabólicas como el catabolismo proteico acelerado, son los procesos que finalmente

producen las manifestaciones clínicas típicas de diabetes mellitus, a saber: poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso.<sup>(4)</sup>

Como se observa, en la diabetes mellitus se presentan síntomas clínicos sólo cuando ya existe una alteración importante del metabolismo de los carbohidratos, por lo cual, tanto para el diagnóstico, como para el seguimiento del tratamiento y la prevención de las complicaciones crónicas de la enfermedad, es necesario el apoyo del laboratorio con el objetivo de descubrir y controlar la diabetes adecuadamente.

### 3. Clasificación de la Diabetes Mellitus, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, 1985:<sup>(2)</sup>

#### A. Clases Clínicas:

##### I. Diabetes Mellitus:

1. Diabetes insulino-dependientes (I)
2. Diabetes no insulino-dependiente (II)
  - a) Sin obesidad
  - b) Con obesidad
3. Diabetes relacionada con malnutrición
  - a) Pancreática-fibrocalculosa
  - b) Asociada a deficiencia proteica
4. Otros tipos de Diabetes relacionados con ciertos estados y síndromes (secundaria):
  - Enfermedad del páncreas
  - Enfermedad de etiología hormonal
  - Procesos provocados por medicamentos o agentes químicos
  - Anomalías de la insulina o de sus receptores
  - Ciertos síndromes genéticos
  - Otros procesos

##### II. Disminución de la tolerancia a la glucosa

- a) Sin obesidad
- b) Con obesidad
- c) Asociada con ciertos estados y síndromes

##### III. Diabetes mellitus del embarazo

#### B. Clases de riesgo estadístico (individuos con tolerancia normal a la glucosa pero considerablemente predispuestos a la diabetes)

- 1) Anomalía previa de la tolerancia a la glucosa
- 2) Anomalía potencial de la tolerancia a la glucosa

La diabetes tipo I es característica de gente joven (<30 años), aunque puede desarrollarse a cualquier edad; resulta de una destrucción autoinmune de las células beta de los islotes de Langerhans, en personas con una predisposición genética. La hiperglicemia y en consecuencia, la manifestación de la enfermedad, sucede cuando la masa de células beta, productoras de insulina, es reducida en un 80 a 90%. Como es debida a una falla absoluta de la producción de insulina, puede conducir a deshidratación importante, sobreproducción de cetonas y cetoacidosis diabética, que es la complicación aguda más frecuente de esta patología; en estos casos, si la administración de fluidos y la terapia con insulina no es iniciada rápidamente el desenlace puede ser fatal. Generalmente se presenta con el antecedente de poliuria, polidipsia, pérdida de peso y debilidad. Su incidencia es de 15 en 100.000 por año en menores de 20 años (1 caso nuevo por cada 7.000 niños por año) y representa sólo el 10% de todos los casos de diabetes. Rara vez necesita prueba de tolerancia a la glucosa para diagnosticarse.<sup>(5)</sup>

La diabetes tipo II es comúnmente de personas mayores (>30 años) y frecuentemente está asociada con obesidad; hay un fuerte elemento de resistencia a la insulina en su etiología, aunque también algún grado de falla de las células beta está implicado, ya que una masa de células beta sanas puede mantener normoglicemia a costa de hiperinsulinemia. Por lo general son resistentes a la cetosis y pueden estar asintomáticos o poco sintomáticos por varios años antes de descubrirse la enfermedad. No son dependientes de insulina, aunque con frecuencia puede usarse como terapia.<sup>(6)</sup>

La diabetes asociada a malnutrición se presenta en la adolescencia o en el adulto joven con historia de malnutrición crónica; generalmente se encuentra en regiones tropicales; la cetosis no se desarrolla y hay resistencia a la insulina.<sup>(2)</sup>

La diabetes mellitus secundaria, resulta de varios procesos, como son: destrucción pancreática (pancreatitis crónica, trauma, cirugía o hemocromatosis) y de insulino-resistencia. Esta última es vista comúnmente como consecuencia del uso de medicamentos (tiacidas, corticosteroides, difenilhidantoina, estrógenos sintéticos, progestágenos, B-bloqueadores, ácido nicotínico, agentes psicoactivos o simpaticomiméticos) o por cantidades excesivas de hormonas hiperglicemiantes como en el síndrome o la enfermedad de Cushing (exceso de cortisol), acromegalia (exceso de hormona de crecimiento), feocromocitona (exceso de catecolaminas), hiperaldosteronismo primario (exceso de mineralocorticoides) o glucagonoma (exceso de glucagon). También se incluyen aquí las anomalías del receptor de la insulina, donde, si la resistencia a la insulina

no es compensada con un incremento sucede en la secreción de la misma, llevará a la diabetes mellitus clínica, como en la acantosis nigricans y síndromes genéticos como distrofias musculares, corea de Huntington, ataxia telangiectasia, ataxia de Friedrich, etc.<sup>(2)</sup>

La disminución en la tolerancia a la glucosa es un estado intermedio de alteración entre la normalidad y la diabetes mellitus franca. Puede ser diagnosticada sólo por una prueba de tolerancia oral a la glucosa; su importancia radica en que existe un riesgo incrementado de enfermedad macrovascular, aunque no de lesiones microvasculares, y en que el 4% por año progresa hacia una diabetes franca. Se cree que la hiperinsulinemia secundaria a la tolerancia a la glucosa alterada, puede incrementar la susceptibilidad para enfermedad cardíaca isquémica o cerebrovascular; aunque esto aún no está completamente claro, hay algunas evidencias sugestivas de un mecanismo subyacente para tal relación causal (intolerancia - enf. macrovascular). Se debe recomendar a estos sujetos mantenerse delgados, hacer ejercicio y reducir otros factores de riesgo cardiovascular.<sup>(2,3)</sup>

La diabetes gestacional o del embarazo, se refiere a la diabetes que se desarrolla durante el embarazo. Si no se controla cuidadosamente, se puede asociar con hipoglicemia neonatal y macrosomía. Alrededor del 70% de estas mujeres normalizarán su tolerancia a la glucosa después del parto, pero el resto puede permanecer diabéticas o desarrollar la enfermedad a corto plazo. Se les recomienda también permanecer en su peso ideal y hacer ejercicio físico moderado.<sup>(2,3)</sup>

La previa anormalidad en la tolerancia a la glucosa, se refiere a aquellas personas que tienen una tolerancia normal en el momento de su evaluación, pero con un antecedente de haber sufrido una diabetes transitoria, una disminución de la tolerancia a la glucosa o una diabetes gestacional. Esta alteración previa del metabolismo hidrocarbonado pudo haber sido producto de una obesidad anterior, de un medicamento hiperglicemiante, de un stress muy importante, etc.

La potencial anormalidad de la tolerancia a la glucosa, se encuentra en personas que nunca han tenido alteraciones en la tolerancia a la glucosa, pero que tienen un mayor riesgo de desarrollarla que la población general, por tener familiares cercanos con diabetes, ser obesos, tener antecedentes de hijos macrosómicos, tener un gemelo idéntico diabético, presencia de anticuerpos antiislotos (ICA), etc. (2).

#### 4.- DIAGNÓSTICO:

##### DIABETES MELLITUS EN EL ADULTO:

Hasta hace algún tiempo, el método más común de detección de la diabetes consistía en la investigación de glucosa en orina, sin embargo hoy sabemos que, aunque la glucosa puede encontrarse en la orina de la mayoría de los casos graves de diabetes, con frecuencia no se encuentra en las formas más leves de la enfermedad, por lo cual no es la más adecuada como método diagnóstico.

Actualmente la diabetes mellitus puede diagnosticarse en las siguientes formas:

1. Diagnóstico basado en síntomas y signos tales como sed intensa (polidipsia), mayor volumen de orina (poliuria), apetito aumentado (polifagia), pérdida de peso inexplicable acompañados de una glicemia al azar elevada (mayor o igual a 200 mg/dl).
2. Diagnóstico con dos glicemias en ayunas mayores de 140 mg%, en un paciente con o sin síntomas típicos. Esta forma de diagnóstico no es aceptada por la OMS, pero sí por otros grupos de estudio de diabetes mellitus como es el Grupo Nacional de Diabetes (USA). Los valores de glucosa aceptados mundialmente son aquellos realizados en plasma con métodos enzimáticos. Esto se debe a que la concentración de glucosa varía de acuerdo al tipo de muestra, ya que en sangre capilar obtenemos valores mayores que en la venosa, y en el plasma hay valores que son un 10% más altos que en sangre completa. El valor normal de glucosa plasmática, medida por métodos enzimáticos en ayunas es de  $90 \pm 25$  mg% y es la primera determinación a realizar cuando se sospecha diabetes mellitus.
3. Diagnóstico con una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) alterada, donde se demuestre una glicemia a las 2 hs. post-carga de glucosa mayor o igual de 200 mg/dl (Cuadro N° 1; Fig. N° 1); la Asociación Americana de Diabetes exige además un punto intermedio de la prueba (30', 60' ó 90') también mayor de 200 mg/dl. La PTOG debe realizarse en la mañana, después de tres días de una dieta libre de restricciones (más de 150 g de carbohidratos por día) y de actividad física normal, esto con el fin de estimular al páncreas para la secreción adecuada de insulina y evitar así falsos positivos en la prueba. Estará precedida de un período nocturno de ayuno de 10 a 16 horas durante el cual podrá tomarse agua. Se registrará la presencia de factores que influyen en la interpretación de los resultados (medicamentos, inactividad, etc.). Debe evitarse el rea-

lizarla cuando el sujeto está sometido a una situación de stress, como es hospitalización o enfermedad aguda. Después de obtenida la muestra de sangre en ayunas, se dan 75 g. de glucosa (o hidrolizados parciales de almidón con un contenido equivalente de carbohidratos) en 250-300 ml de agua en el curso de 5 minutos. Es preciso recoger la muestra de sangre 2 horas después de administrar la sobrecarga de glucosa; si se considera apropiado, también pueden tomarse muestras cada media hora durante este período.<sup>(1)</sup>

Esta prueba está indicada cuando: a) la glucosa plasmática en ayunas está en los límites (115 a 140 mg/dl); b) la glucosa plasmática en ayunas es normal pero el paciente tiene síntomas compatibles con una complicación de diabetes (retinopatía, neuropatía, nefropatía, macroangiopatía, hipertriglicéridemia, etc.); c) la glucosa plasmática es normal en ayunas, pero el sujeto tiene factores de riesgo de diabetes como la obesidad, antecedentes familiares de diabetes, hijos macrosómicos, etc. Se debe señalar que glicemias en ayunas o al azar por debajo de 100 mg% hacen improbable el diagnóstico de diabetes, aunque hay ciertos casos donde se evidencia hiperglicemia sólo en estado post-prandial.<sup>(2,3)</sup>

La PTOG no es la ideal para realizar el diagnóstico ya que su reproducibilidad es baja y tiene un alto coeficiente de variación (25%) en la muestra de 2 horas post-carga, sin embargo, es la aceptada como método de diagnóstico. <sup>(1,3)</sup>

#### DIABETES MELLITUS EN EL NIÑO:

La diabetes en el niño se presenta generalmente con síntomas graves, por lo que el diagnóstico se confirma sin demora midiendo la glucosa sanguínea, y el tratamiento se inicia de inmediato a fin de detener una evolución fatal. Esta forma de presentación denominada cetoacidosis diabética, requiere un seguimiento estrecho tanto clínico como de laboratorio: glicemias para determinar el grado de severidad de la hiperglicemia repetidas cada 1 ó 2 horas para conducir la terapia con insulina; gases arteriales para determinar la intensidad de la acidosis metabólica y decidir sobre la necesidad de administrar bicarbonato de sodio; electrolitos para hacer seguimiento de los niveles de sodio y sobre todo de potasio en sangre; cetonas en sangre y orina para asegurar el diagnóstico de cetoacidosis diabética y para seguir la evolución del tratamiento. En este caso la PTOG no es necesaria ni apropiada. Sin embargo, un pequeño número de niños y adolescentes presentan síntomas menos graves y puede ser necesario recurrir a la PTOG para diagnosticarlos. La carga de glucosa a administrar en ellos es de 1,75 g de

glucosa/kg de peso hasta un total de 75 g. La interpretación es igual a la de los adultos. En los niños no se utiliza como forma de diagnóstico la determinación de dos glicemias en ayunas  $\geq 140$  mg%, sino que debe acompañarse por una curva de tolerancia a la glucosa con criterios de diabetes mellitus.<sup>(4,5)</sup>

Es indispensable estar plenamente seguros del diagnóstico. Los requisitos para confirmar el diagnóstico de diabetes en un paciente que tiene síntomas graves e hiperglicemia muy elevada serán distintos de los necesarios en un paciente asintomático cuya glicemia apenas rebasa el límite establecido con fines de diagnóstico. En este último caso, conviene obtener al menos otro resultado cuyo valor esté dentro de la escala de diabetes, ya sea en una muestra aleatoria o en una PTOG.<sup>(2)</sup>

Generalmente no hay pruebas de rutina disponibles para diferenciar diabetes tipo I y II, sino que se clasifican por las manifestaciones clínicas, edad y presencia o no de cetonas en orina.

#### DISMINUCIÓN DE LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA

El estado de disminución en la tolerancia a la glucosa (DTG) se define como una respuesta glicémica a la sobrecarga habitual de glucosa que se sitúa entre la respuesta normal y la diabética y por consiguiente, sólo puede determinarse mediante la PTOG. Se diagnostica cuando a las 2 horas post-carga de glucosa se encuentra glicemia entre 140 y 200 mg/dl (Cuadro N° 1). La definición de DTG sustituye los términos de diabetes limítrofe, pre-diabetes o diabetes química que se usaban con anterioridad. Además de las recomendaciones ya mencionadas, es necesario repetir la PTOG cada año para determinar si este paciente se hizo diabético, si continuó con la DTG o se normalizó. Muchas veces al cambiar el estilo de vida (sedentarismo), al lograr su peso corporal ideal, o al descontinuar algún medicamento hiperglicemiante, estas personas pueden normalizar su tolerancia a la glucosa.<sup>(3)</sup>

#### DIABETES GESTACIONAL

El diagnóstico es complicado por el efecto del embarazo normal sobre la tolerancia a la glucosa, que produce niveles de glicemia en ayunas más bajos que en la no embarazada pero más altos después de una sobrecarga de glucosa.

La diabetes del embarazo es una categoría aplicable únicamente a las mujeres en las que se destaca por primera vez intolerancia a la glucosa durante el embarazo. Es necesario hacer una reclasificación después del parto. En el informe sobre la segunda reunión del Comité de Expertos de la OMS

en Diabetes Sacarina<sup>(2)</sup> se recomendó que los procedimientos y criterios de diagnósticos relativos a la embarazada deberían ser iguales a los propuestos para todos los adultos. Se recomendó además que el tratamiento de la DTG durante el embarazo fuera el mismo de la diabetes. Tal recomendación es diferente a la del Grupo Nacional de Diabetes (USA), quienes proponen mantener los criterios de O'Sullivan, los cuales se han usado hasta ahora y se basan en una carga de 100 g de glucosa y determinaciones de glicemia por tres horas:

Basal:	105 mg%
1h:	190 mg%
2h:	165 mg%
3h:	145 mg%

Dos valores por encima de éstos hacen diagnóstico de Diabetes Gestacional.

Varios países han adoptado ya las recomendaciones formuladas por la OMS, sin embargo, la ulterior normalización internacional de los criterios diagnósticos de la diabetes del embarazo puede constituir la base de estudios prospectivos sobre la salud de las madres y de sus hijos. Recientemente se ha reportado en un estudio en mujeres embarazadas, que niveles de glicemia de 135% a las dos horas de una carga de 75 g de glucosa deben ser aceptados como normales para mujeres en el segundo trimestre y de 170 mg% en el tercer trimestre.<sup>(7)</sup> Otro estudio demuestra que niveles de glucosa por debajo de 180 mg% 2 hs después de 100 g de glucosa, o de 160 mg%, una hora después de una carga de 50 g, no se asocian con riesgo neonatal incrementado.<sup>(8)</sup> En este sentido, el empleo de los criterios de la OMS permite determinar más específicamente el efecto de grados menores de intolerancia a la glucosa en la salud materno-infantil, ya que considera tanto la DTG como la diabetes franca (valores de glicemia mayores o iguales de 140 mg% 2 horas post-carga, vs 165 y 145 mg% a la segunda y tercera hora post-carga en los criterios de O'Sullivan).

El descarte de diabetes del embarazo se debe realizar a todas las mujeres embarazadas entre las 24-28 semanas de gestación, principalmente en mujeres mayores de 24 años de edad, en las cuales la prevalencia de esta alteración es mayor.<sup>(1,2,3)</sup>

#### PRUEBAS NO GLICÉMICAS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES MELLITUS:

Algunas mediciones «no glicémicas» pueden ser útiles para definir subclases y determinar los mecanismos de la diabetes. Dentro del marco del diagnóstico y de la clasificación, estos índices pertenecen a dos grupos:

**1. Índices del grado de afectación de las células beta:** que comprenden mediciones de la secreción de insulina, proinsulina y péptido C, tanto en condiciones basales como en respuesta a una estimulación. Recientemente se ha observado que los diabéticos tipo I, presentan una respuesta reducida de la primera fase de secreción de insulina a glucosa endovenosa (EV), antes de manifestar la enfermedad, por lo que se considera un hallazgo premonitorio de la misma. En los casos que reciben insulina exógena, la determinación del péptido C, sustancia que es producida junto con la insulina a nivel de las células beta del páncreas, es un indicador de la actividad secretora de insulina.

Si al realizar la PTOG, se mide también la curva de insulina, se puede demostrar que para un nivel normal de glucosa en ayunas y post-carga, se necesita cierta cantidad de insulina, que no debe exceder, en ayunas de 15 mU/ml y post-carga de 100 mU/ml (fig.2); igualmente se muestra en los casos de DTG o en los primeros años de diabetes mellitus tipo II que para mantener los niveles de glucosa sanguínea, son necesarias mayores cantidades de insulina que las normales, lo cual refleja resistencia periférica a la insulina (fig. 3); finalmente, en los casos de diabetes mellitus tipo I o en las etapas posteriores de la diabetes tipo II se observan glicemias elevadas con una deficiencia franca de insulina (fig. 4).<sup>(9,10)</sup>

**2. Índices del proceso diabetógeno:** incluyen la caracterización de tipos y subtipos de antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad (HLA); la presencia, el tipo y el título de los anticuerpos circulantes contra los islotes del páncreas y otras células endocrinas; la demostración de inmunidad celular contra el páncreas; la demostración de secuencias específicas de ADN en el genoma humano y la demostración de enfermedades pancreáticas u otras enfermedades endocrinas.<sup>(6)</sup>

Hay esperanzas del posible diagnóstico de diabetes mellitus antes del inicio de la enfermedad, sobre todo para la tipo I, la cual se ha asociado con los antígenos de histocompatibilidad HLA DR3 y DR4, los cuales pueden jugar un papel en la patogénesis de la enfermedad. Recientemente, la alta prevalencia de un aminoácido particular en la posición 57, sobre la cadena beta-DQ del antígeno HLA, en personas con diabetes mellitus insulino-dependiente, ha sugerido que este efecto sobre la estructura terciaria de la molécula pueda ser importante en su reconocimiento por el sistema inmune y su activación subsecuente. El refinamiento en la identificación de los hallazgos genéticos asociados con esta patología continúa.<sup>(1)</sup>

Se conoce desde hace años que la diabetes mellitus tipo I es de etiología autoinmune, inicialmente por la observación de infiltración linfocítica de los islotes y luego por el descubrimiento de una variedad de autoanticuerpos circulantes en pacientes con diabetes establecida. Los más importantes de éstos han sido los anticuerpos de células de los islotes (ICA), los cuales están dirigidos contra un antígeno desconocido (probablemente un glicolípido), presente en todas las células endocrinas de los islotes; son el marcador más útil de una futura diabetes y pueden preceder por varios años a la falla de la función de los islotes. Se miden en unidades JDF de actividad, mediante diferentes métodos (inmunoquímicos o inmunofluorescencia) y el riesgo de desarrollar diabetes aumenta en paralelo con los títulos de estos anticuerpos.<sup>(11,12)</sup>

También se han descubierto los anticuerpos anti-insulina (IAA), los cuales son, hasta el presente, los únicos dirigidos contra antígenos claramente específicos de las células beta. Además, el antígeno decarboxilasa del ácido glutámico (GAD) es una enzima que se expresa en la superficie de las células beta y es reconocido por las células T citotóxicas, teniendo así el potencial para iniciar un proceso que conlleve a destrucción de la célula beta.

La combinación de ICA, IAA y una respuesta reducida de la primera fase de secreción de insulina a la glucosa EV, pueden ofrecer una predicción altamente específica en miembros de la familia de un diabético tipo I, y en consecuencia, hacerlos susceptibles de terapia preventiva.<sup>(1,12)</sup>

## 5. TERAPIA Y CONTROL DE LA DIABETES MELLITUS

Los objetivos del tratamiento de la diabetes son los siguientes:

1. Eliminar los síntomas de diabetes y permitir al paciente volver a su vida activa y productiva, con una dieta y ejercicio apropiados para mantener peso corporal adecuado; los niveles de glucosa elevada conllevan a una serie de alteraciones que producen debilidad, deshidratación, pérdida de peso, alteración de las defensas contra las infecciones e inclusive cetosis.
2. Prevenir el desarrollo de las complicaciones de la diabetes. Hoy día, con los resultados del Estudio sobre el Control de la Diabetes y sus Complicaciones (DCCT)<sup>(15)</sup> ya no hay dudas de la relación entre mal control glicémico y complicaciones crónicas de la diabetes, por lo cual, es necesario mantener la glicemia dentro del rango más normal posible, independientemente del tipo de dia-

betes y del tratamiento, sea dieta y ejercicio solamente, o asociados a hipoglicemiantes orales o insulina. Para lograr este objetivo, no solamente podemos guiarnos por la clínica, ya que sabemos que las manifestaciones se presentan cuando los niveles de glucosa en sangre están sumamente elevados, mientras que las complicaciones se evitan con un control glicémico mucho más estricto; debemos, en consecuencia, apoyarnos en pruebas de laboratorio que reflejen el control glicémico.

3. Detectar y evitar los factores de riesgo adicionales para arterioesclerosis, tales como el cigarrillo, la HTA y las dislipidemias.<sup>(3,13)</sup>

El monitoreo del tratamiento de los pacientes diabéticos debe ser el siguiente:

- A) Control con glicemia capilar o de laboratorio, cuya frecuencia depende de si usa insulina o no. Si es un diabético tipo II que se controla sólo con dieta, ejercicio e hipoglicemiantes orales, es suficiente una glicemia quincenal o mensual tanto en ayunas como postprandial, sin embargo, si se trata de un diabético tipo I o II que usa varias dosis diarias de insulina, son necesarias 3 ó 4 glicemias capilares diarias para poder realizar un ajuste de la dosis y lograr el autocontrol. En base a los últimos hallazgos,<sup>(15)</sup> los niveles ideales requeridos de glicemia, han cambiado, y son los siguientes:

### Glicemia (mg/dl)

Preprandial	70-130
1 h Postprandial	100-180
2 h Postprandial	80-150
2-4 h Postprandial	70-120

Estos deben ajustarse al caso particular, pudiendo ser menos exigentes en pacientes con evidencia de cardiopatía isquémica o de hipoglicemias severas frecuentes.

- B) Control de glucosuria y cetonuria, sobre todo cuando los pacientes diabéticos tipo I no se realizan glicemias capilares, o cuando estas glicemias son mayores de 250 mg/dl, con el objeto de descubrir una cetoacidosis diabética. Para los cuerpos catiónicos se usa la prueba con nitroprusiato (Acetest) o de tiras reactivas (Ketostix).

- C) **Hemoglobina glucosilada (Hb A1) y lipidograma:** la hemoglobina es susceptible de ser glucosilada. La glucosilación es un proceso no enzimático e irreversible que consiste en la unión

de una molécula de glucosa a la valina terminal de la cadena beta y a los grupos amino de las lisinas de la cadena alfa y beta de la Hb A1. El grado de glucosilación es directamente proporcional al valor de la glucosa sanguínea. La hemoglobina glucosilada (Hb A1) está cargada más negativamente que la no glucosilada y puede leerse separadamente. Dentro de la Hb A1 se describen los subtipos Hb A1a, A1b y A1c, siendo la fracción Hb A1c más resistente a las influencias de temperatura y momento de toma de la muestra de sangre, y por tanto, más fidedigna como prueba clínica.

Según el método utilizado para la determinación de la Hb A1, se describen factores diferentes a la glicemia que pueden afectar sus niveles. Con el método de cromatografía usando microcolumnas o de intercambio de cationes, la hemólisis, la pérdida de sangre y el embarazo incrementan el recambio de glóbulos rojos y causan una correspondiente reducción en la Hb A1 independientemente de la exposición glicémica. Los Tg y la bilirrubina pueden alterar los resultados, así, el exceso de Hb C y de Hb S la disminuyen, mientras que el aumento de Hb F la incrementan. Otras sustancias con capacidad de unirse a la Hb pueden llevar a sobreestimación de la glucosilación, como se observa en pacientes con adicción a opiáceos, uremia, alcoholismo y altas dosis de aspirina.<sup>(1,16,17)</sup> La determinación de la Hb A1c debe realizarse 2 a 4 veces al año.

En base a lo anterior, los criterios de control según las pruebas de laboratorio, se pueden clasificar como sigue:

**Control Metabólico Excelente:**

- Hb A1c: 6-7% o Hb A1: 7-9%
- Valor promedio de monitoreo de glicemia preprandial: 70-120 mg/dl y postprandial: <180 mg/dl
- No glucosuria ni cetonuria

**Control Metabólico Aceptable:**

- Hb A1c: 8-9% o Hb A1: 10-11%
- Valor promedio de monitoreo de glicemia preprandial: 120-180 mg/dl y postprandial: <200 mg/dl
- Glucosuria intermitente
- Cetonuria rara vez

En la diabética embarazada y en la diabetes de la gestación, las metas son más estrictas:

- Hb A1c: 5,5-6,5% o Hb A1 de 5,5-7%
- Valor promedio de monitoreo de glicemia preprandial: 60-100 mg/dl y post-prandial: <120 mg/dl.<sup>(3)</sup>

En relación al metabolismo lipídico, son conocidos los múltiples disturbios del mismo en los pacientes diabéticos, lo cual es muy perjudicial, ya que un perfil lipoproteico alterado es un factor de riesgo adicional para la arteriosclerosis acelerada y precoz que se observa en estos pacientes. Se debe realizar un lipidograma por lo menos una vez al año en todo paciente con diabetes, y si se encuentra alguna alteración, debe realizarse aún con más frecuencia. Cualquier dislipidemia encontrada debe recibir tratamiento apropiado, pero es conveniente recordar que existe una asociación bien demostrada entre el control metabólico y el perfil lipídico de los pacientes, por lo cual, la primera medida a tomar es lograr el buen control glicémico. Los niveles ideales de los lípidos y lipoproteínas en los diabéticos son los siguientes: triglicéridos (Tg) <150 mg/dl; colesterol total (CH) <200 mg/dl; colesterol de la lipoproteína de alta densidad (C-HDL) <35 mg/dl y colesterol de la lipoproteína de baja densidad (C-LDL) <130 mg/dl.<sup>(14)</sup>

D) Examen clínico y paraclínico anual para la detección de complicaciones: el DCCT es un estudio multicéntrico, donde intervinieron 1.441 pacientes con diabetes tipo I, entre 13 y 39 años de edad, quienes fueron controlados y seguidos en 29 centros de USA y Canadá, desde 1983 hasta 1993. Los pacientes fueron divididos al azar en dos grupos, uno que recibió la terapia insulínica, nutricional y de ejercicio físico convencional, manteniendo niveles de Hb A1 alrededor de 7%. Se demostró que el porcentaje de pacientes que desarrolló retinopatía, microalbuminuria (manifestación de inicio de nefropatía diabética) y neuropatía, fue significativamente menor en el grupo de mejor control. Igualmente se demostró que la progresión de estas complicaciones, en aquellos pacientes que habían iniciado la alteración antes de ingresar al estudio, fue menor en el grupo de terapia intensiva. Estas observaciones claramente demuestran, que las complicaciones crónicas de la diabetes pueden ser prevenidas con un mejor control metabólico.<sup>(15)</sup>

En caso de que estas complicaciones no puedan ser evitadas, la detección temprana puede permitir un tratamiento precoz, antes de que causen una morbilidad significativa, por lo que se recomienda en todos los diabéticos tipo II y en aquellos diabéticos tipo I con más de 5 años de duración de la enfermedad, la realización una vez al año de las pruebas de descarte de complicaciones. Como ejemplo, podemos mencionar que el tratamiento precoz con rayos láser en la retinopatía, disminuye la frecuencia de ceguera. También es importante considerar que la causa más frecuente de mortalidad en los

diabéticos tipo I es la nefropatía diabética y en los tipo II es la macroangiopatía diabética (enfermedad isquémica coronaria), lo cual justifica plenamente su prevención y luego su detección y tratamiento precoz.<sup>(13, 18, 19)</sup>

Para la detección de nefropatía diabética es necesaria la evaluación una vez al año del funcionamiento renal. Uno de los cambios funcionales más tempranos es el hallazgo de hiperfiltración renal detectado por una velocidad de filtración glomerular mayor de 150 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, el cual produce un aumento de la presión intraglomerular y de la permeabilidad de la membrana basal glomerular, con pérdida de mínimas cantidades de albúmina por la orina, lo cual se denomina microalbuminuria. Esta se define como la velocidad de excreción de albúmina  $\geq 30$   $\mu$ g/min, o según otros  $\geq 40$  mg de albúmina en 24 hs. La microalbuminuria es uno de los signos más tempranos y fácilmente detectable de inicio de nefropatía diabética, la cual está en etapa silente, en relación a las manifestaciones clínicas.<sup>(20)</sup> En la diabetes tipo II, se ha comprobado que la microalbuminuria también indica alto riesgo de enfermedad cardiovascular.<sup>(15)</sup> El hallazgo de proteinuria franca (excreción de proteínas en orina  $\geq 300$  mg/24 hs) y de disminución de la velocidad de filtración glomerular sugieren una nefropatía ya establecida, aunque los niveles de creatinina sérica permanezcan aún dentro del rango normal. Algunas de las causas de proteinuria fisiológica, que no tienen relación con la enfermedad glomerular diabética son: el ejercicio físico, la deshidratación, el estrés, la hipertermia, la exposición al frío, la postura (la proteinuria ortostática que se presenta en el 3 a 5% de los adultos jóvenes sanos); éstas deben ser descartadas mediante el seguimiento del paciente.<sup>(1)</sup>

Cuando ya está instalada la nefropatía, debe hacerse el seguimiento con la determinación de la velocidad de filtración glomerular (clearance de creatinina), la cuantificación de proteinuria en 24 horas y el nivel de creatinina sérica. Cuando el clearance es menor de 30 ml/min y la creatinina sérica mayor de 8 mg/dl, debe pensarse en terapia sustitutiva renal (diálisis o transplante renal). Las

medidas preventivas, como el control metabólico adecuado, son importantes antes de que la nefropatía esté plenamente instalada, ya que en etapas posteriores estas medidas no son efectivas. Ayuda a disminuir la progresión de una nefropatía hacia la insuficiencia renal, el control adecuado de la tensión arterial, evitar las infecciones urinarias e iniciar una dieta de restricción proteica.<sup>(13, 21, 22)</sup>

La retinopatía diabética es la causa más común de ceguera en gente joven, y debido a que es prevenible si la terapia comienza suficientemente temprano, el diagnóstico precoz mediante un descarte regular es mandatorio en toda persona post-puberal con diabetes. Se realiza mediante el examen clínico de oftalmoscopia más fotografías del fondo. Cuando sea necesario, generalmente antes de terapia con láser, se realiza angiografía con fluoresceína. La retinopatía pre-proliferativa y proliferativa debe ser estabilizada con la terapia de rayos láser, antes de que suceda cualquier complicación (desprendimiento de retina, hemorragia del vítreo, etc.).<sup>(13, 23)</sup>

El daño del sistema nervioso (neuropatía diabética) puede complicar cualquier forma de diabetes, independientemente de su etiología. La base de su detección es el examen físico; luego se pueden hacer otros estudios de la especialidad, tanto de neuropatía periférica como autonómica.<sup>(13, 24)</sup> En la detección de macroangiopatía diabética también es importante el examen físico mediante la palpación de los pulsos arteriales periféricos, sobre todo de miembros inferiores. Ante cualquier hallazgo se puede realizar ultrasonido abdominal y doppler de miembros para descubrir alguna lesión susceptible de tratarse con dilatación del vaso o angioplastia, evitando la amputación. También puede ser necesaria la prueba de esfuerzo o el monitoreo cardíaco ambulatorio, buscando enfermedad cardíaca isquémica asintomática.<sup>(13, 19)</sup>

#### AGRADECIMIENTO:

Nuestro agradecimiento al Dr. Humberto Nucete, bioanalista, médico endocrinólogo y nuestro profesor, por la revisión crítica de este manuscrito.

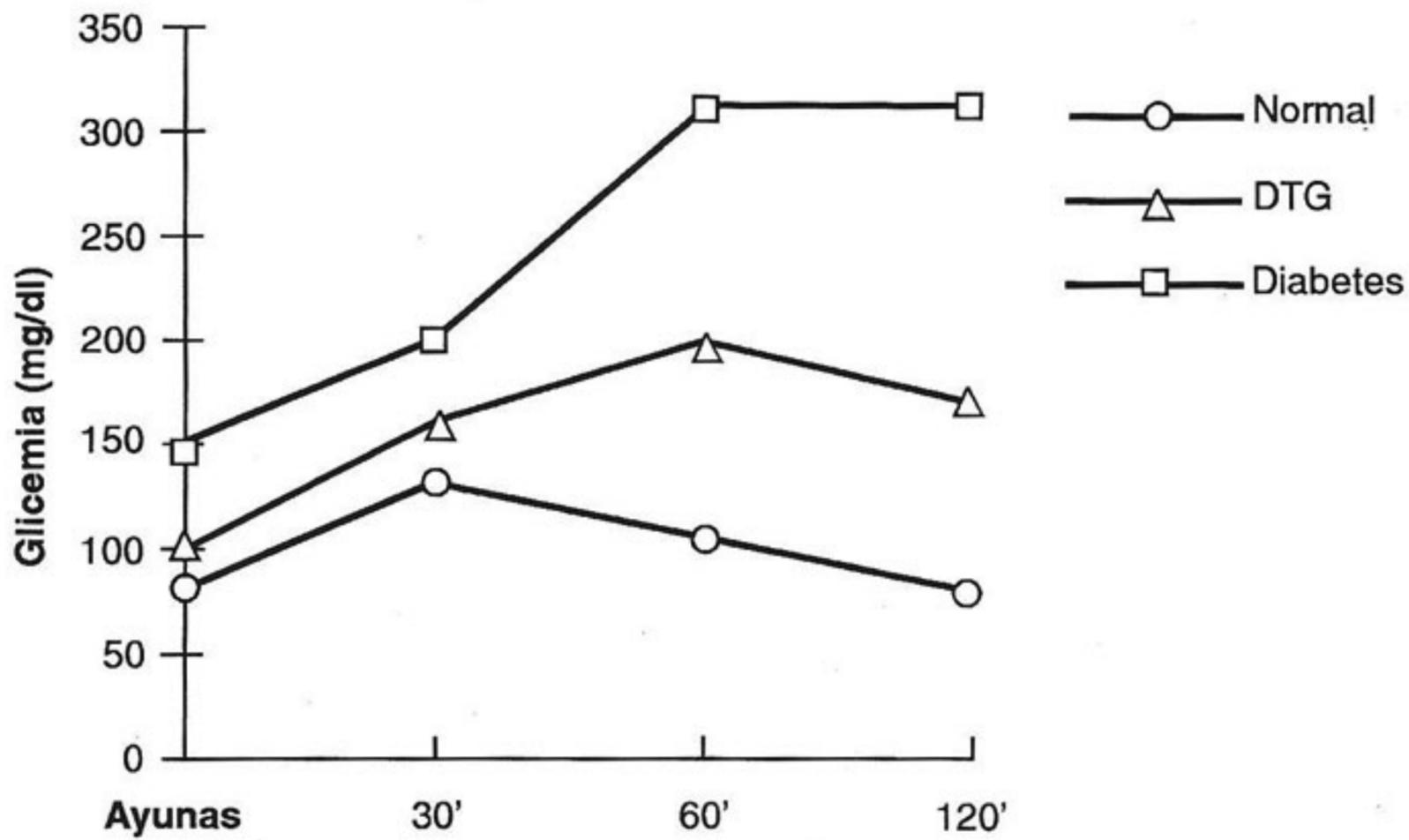
**CUADRO No 1**

**VALORES DIAGNÓSTICOS EN LA PRUEBA ORAL DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA**

CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (mg/dl)	
PLASMA	
<b>NORMAL</b>	
Ayunas	≥ 115
2 hs post-carga	< 140
<b>DIABETES MELLITUS*</b>	
Ayunas	≥ 140
2 hs. post-carga	≥ 200
<b>INTOLERANCIA A LA GLUCOSA</b>	
Ayunas	< 140
2 hs. post-carga	140-200

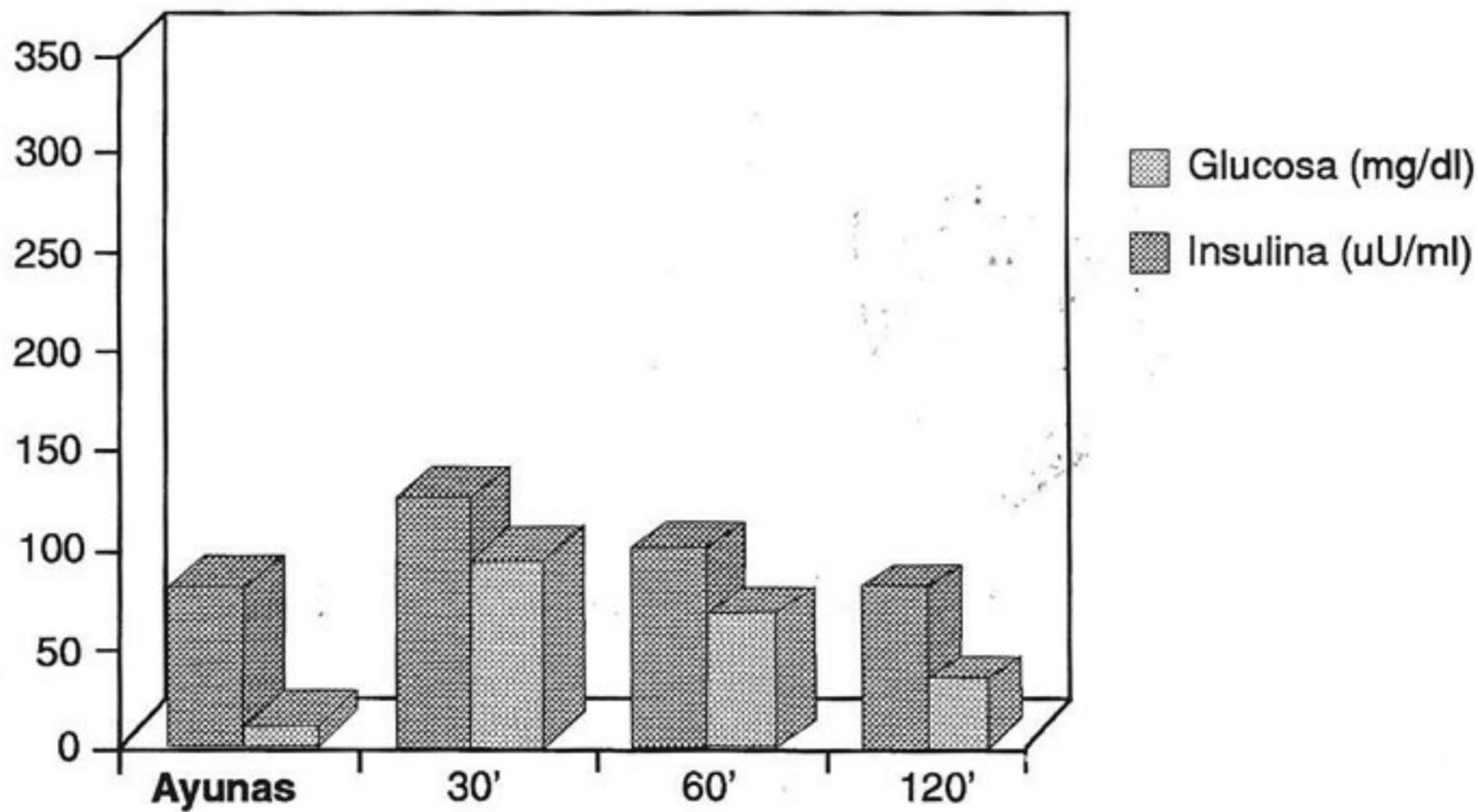
\* El Grupo Nacional de Diabetes (USA) sugiere además un valor intermedio (30, 60 ó 90 minutos post-carga) de glicemia ≥200 mg% para el diagnóstico.

Figura No. 1



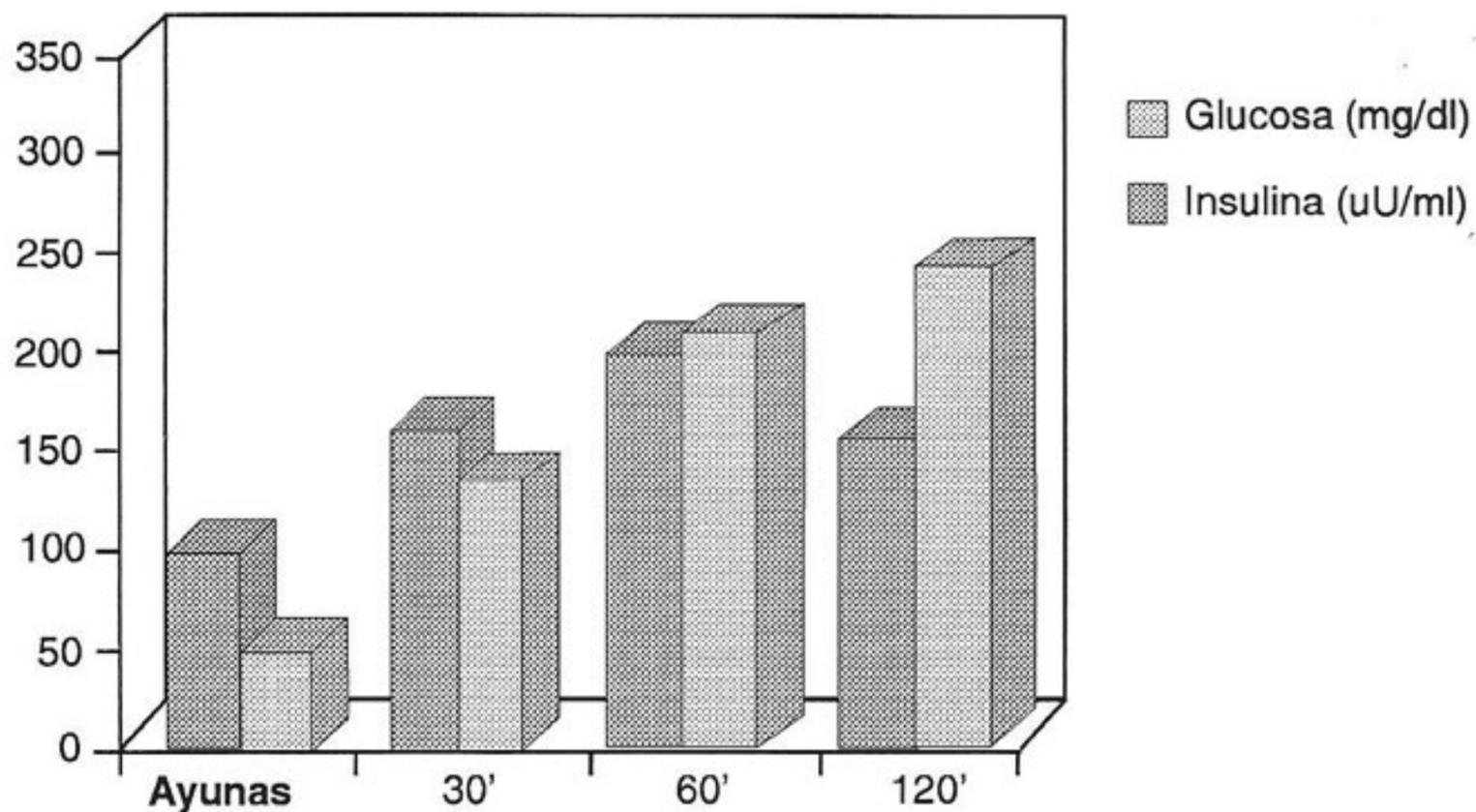
PTOG en sujetos normales, con disminución de la tolerancia a la glucosa y con diabetes mellitus.

Figura No. 2



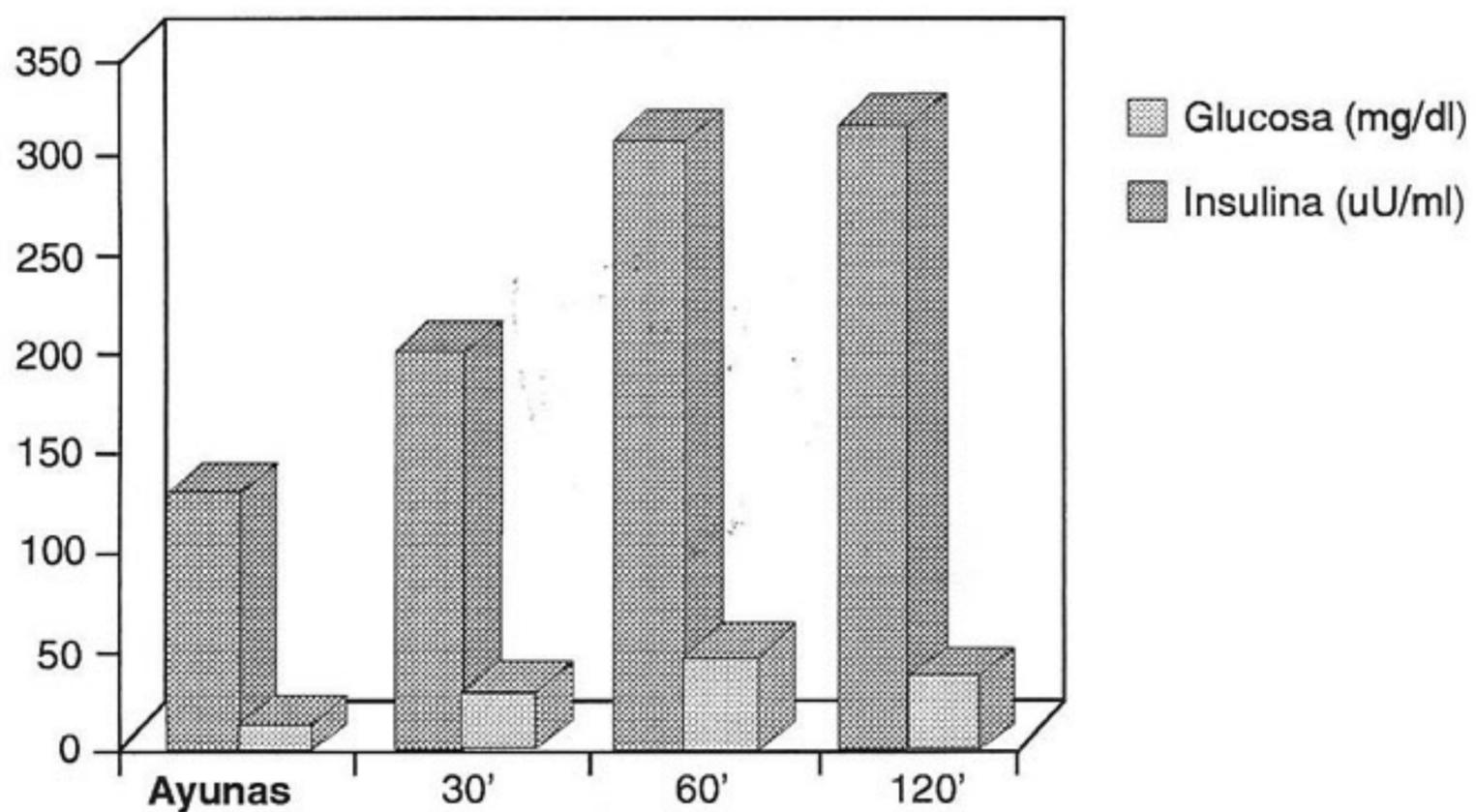
Glicemia e insulinemia en la PTOG de sujetos normales

**Figura No. 3**



**Glicemia e insulinemia en la PTOG de sujetos con disminución en la tolerancia a la glucosa o primeros años de diabetes mellitus tipo II.**

**Figura No. 4**



**Glicemia e insulinemia en la PTOG de sujetos con diabetes mellitus**

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aniel S, Gale E. Diagnostic tests in diabetes mellitus and hypoglycaemia. In: Bouloux P, Rees L. *Diagnostic Tests in Endocrinology and Diabetes*. London, 1994, 187-214.
2. Comité de Expertos en Diabetes de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Informe Técnico OMS, 1988: 11-19 y anexos.
3. American Diabetes Association. *Physician's Guide to Insulin-Dependent Diabetes. Diagnosis and Treatment*, 1988: 3-28.
4. Kitabchi A, Murphy M. Diabetic ketoacidosis and hyperosmolar hyperglycemic nonketotic coma. *Medical Clinics of North America* 1988, **72**: 1545-1563.
5. Menon R, Sperling M. Childhood diabetes. *Medical Clinics of North America* 1988, **72**: 1565-1576.
6. Felber J, Haesler E, Jéquier E. Metabolic origin of insulin resistance in obesity with and without type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993, **36**: 1221-1229.
7. Hatem M, Anthony F, Hogston P, Rowe D, Dennis K. Reference values for 75 g oral glucose tolerance test in pregnancy. *British Medical Journal* 1988, **296**: 676-678.
8. Weiner C. Effect of varying degrees of normal glucose metabolism on maternal and perinatal outcome. *American Journal of Obstetric and Gynecology* 1988, **159**: 862-870.
9. Yalow R, Rose H, Bauman W. Hyperinsulinemia. *The American Journal of Medicine* 1988, **85**: 22-30.
10. Olefsky J, Garvey T, Henry R, Brillon D, Matthei S, Freidenberg G. Cellular mechanisms of insulin resistance in non-insulin-dependent (type II) diabetes. *The American Journal of Medicine* 1988, **85**: 86-105.
11. Bingley P, Christie M, Bonifacio E, Bonfanti R, Shattock M, Fonte M, et al. Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. *Diabetes* 1994, **43**: 1304-1310.
12. Petersen J, Dyrberg T, Karlsen A, Molvig J, Michelsen B, Nerup J, et al. Glutamic acid decarboxylase (GAD65) autoantibodies in prediction of B-cell function and remission in recent-onset IDDM after cyclosporin treatment. *Diabetes* 1994, **43**: 1291-1296.
13. Kolterman O. Etiology and pathogenesis of Diabetes Mellitus. In Sussman, K; Draznin, B. and James, W, *Clinical Guide to Diabetes Mellitus*, New York, 1987, Chapter 1: 1-14.
14. Orchard T. Dyslipoproteinemia and diabetes. *Clinics of Endocrinology and Metabolism of North America* 1990, **19**: 361-380.
15. DCCT. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine* 1993, **329**: 977-986.
16. Gabbay K. Glycosylated and diabetes mellitus. *Medical Clinics of North America* 1982, **66**: 1309-1315.
17. Yamanouchi T, Akanuma Y, Toyota T, Kuzuya T, Kawai T, Kawazu S, et al. Comparison of 1,5-anhydroglucitol, Hb A1c and fructosamine for detection of diabetes mellitus. *Diabetes* 1991, **40**: 52-57.
18. Krolewski A, Kaysen G, Meyer T, Schambelan M. Diabetic nephropathy: hemodynamic basis and implications for disease management. *Annals of Internal Medicine* 1989, **110**: 795-813.
19. Colwell J, Lopes-Virella M. A review of the development of large-vessel disease in diabetes mellitus. *The American Journal of Medicine* 1988, **85**: 113-118.
20. Miller D. Kidney disease in diabetes mellitus. In Sussman, K; Draznin, B. and James, W, *Clinical Guide to Diabetes Mellitus*, New York, 1987, Chapter 8: 117-128.
21. Tung P, Levin S. nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The American Journal of Medicine* 1988, **85**: 131-136.
22. Bending J, Dodds R, Keen H, Viberti G. Renal response to restricted protein intake in diabetic nephropathy. *Diabetes* 1988, **37**: 1641-1646.
23. Klein R, Klein B, Moss S. The Wisconsin Epidemiological Study of diabetic retinopathy: a review. *Diabetes/Metabolism Reviews* 1989, **5**: 559-570.
24. Schumer M, Burton G, Crum D, Pfeifer M. Diabetic Autonomic Neuropathy - Part 1. *The American Journal of Medicine* 1988, **85**: 137-143.