

EDITORIAL

LAS NUEVAS REALIDADES DE LA EDUCACIÓN SUPERIOR EN AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE

Germán Anzola Montero
Rector

En París, del 5 al 9 de octubre de 1998, se realizó la primera Conferencia Mundial sobre Educación Superior, organizada y convocada por la UNESCO. De conformidad con los reportes asistieron 182 países, representantes de sus respectivos gobiernos; se calcula que el número de participantes fue superior a las 4000 personas. Para la Educación Superior colombiana y particularmente para sus Universidades, la conferencia generó grandes expectativas, tanto en los momentos previos, como durante su realización y subsiguientemente. Como actividad preparatoria, la reunión de París estuvo precedida de conferencias a nivel de los diferentes continentes: Asia, Europa, África y América Latina. Específicamente, en noviembre de 1996, en la ciudad de La Habana, Cuba, se llevó a cabo la conferencia para América Latina y el Caribe convocada por el Instituto Internacional para la Educación Superior para América Latina y el Caribe de la UNESCO. Las instituciones más representativas de la región estuvieron presentes y fue allí donde se definió la orientación y los contenidos a presentar en París.

La Conferencia Mundial del 98 tuvo como resultado los documentos: “La Declaración Mundial sobre la Educación Superior en el siglo XXI: Visión y Acción” y “Marco de Acción Prioritaria para el Cambio y el Desarrollo de la Educación Superior”. De conformidad con lo expresado en el trabajo del Profesor Rafael Guarda, ex rector de la Universidad de la República (Uruguay), estos textos enfatizaron en el desarrollo futuro de la Educación Superior en el nuevo papel del conocimiento, como instrumento fundamental para el desarrollo sostenible de las sociedades modernas, siendo a partir de este concepto, que se considera a la Educación Superior como un derecho e igualmente como una herramienta vital para la construcción del futuro de toda sociedad. Continúa el Profesor Guarda, que la Educación Superior se contempla como un bien público, lo cual significa

que ella es un bien, patrimonio de la sociedad entera, en una nación dada. Ante esta consideración quisiera ratificar que éste es igualmente para la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, el principio consagrado en su Proyecto Educativo Institucional PEI y en sus Estatutos.

En las declaraciones de la Conferencia, se ratifica la necesaria libertad académica en su seno y el papel de los Estados en el respaldo y fortalecimiento de sus Universidades. Personalmente, añadiría frente a este concepto, dentro de la muy particular organización de la Educación Superior en Colombia, ¿cuál ha sido el comportamiento del Gobierno para con las Universidades estatales?, que son de su responsabilidad y, de igual manera, ¿cuáles frente a las Universidades privadas? ¿Qué se ha hecho a partir de las citadas declaraciones?, ¿será que después de diez años ese respaldo y fortalecimiento, en lugar de señalarse como un logro, tendremos que identificarlo como una mayor debilidad?

Otro aspecto tratado en las Declaraciones fue el de la democratización de la Educación Superior, expresado en el acceso de hombres y de mujeres con fundamento en sus méritos y lejos de considerar discriminación alguna de raza, de género, de idioma, de religión, de limitaciones físicas o razones económicas, culturales o sociales. También tiene sentido, al hablar de democratización, considerar lo relativo a la gobernabilidad de las Universidades, en lo referente a la activa y decidida participación de los actores en la vida universitaria. ¿Los diferentes estamentos representados en dichos esquemas de gobierno han sido consecuentes con su compromiso y con su responsabilidad frente a la organización universitaria? Conceptúo, frente al tema de la democratización, en el caso de la U.D.C.A, como el momento de evaluarlo en cada uno de los aspectos, anteriormente señalados,

cuáles son los resultados concretos al haber consagrado, en nuestros planes de desarrollo similares, consideraciones respecto a la admisión de estudiantes. Hemos construido, como asunto nuevo, la representación en sus máximos órganos de gobierno en la U.D.C.A, la presencia de estudiantes y de profesores.

Continuando con la síntesis de las dos Declaraciones de París, se destacan los siguientes elementos: el significado e importancia que en épocas presentes ha de jugar la educación puramente dirigida a egresados, a adultos y a todos quienes puedan demandar conocimientos ofrecidos por las instituciones de educación superior, hecho este, a lo cual se le dio la denominación de educación para toda la vida. Otro aspecto declarado hace referencia a las relaciones que han de sostener las Universidades con las demás del sistema educativo, haciendo énfasis en la formación de educadores para dichos niveles, procesos de diseño curricular e investigación en aspectos propios de las ciencias de la educación. Se hace especial consideración al tema de las reales y concretas relaciones de las Universidades con la sociedad, hecho denominado y tratado bajo el concepto de pertinencia; se destaca, la función investigativa como quehacer esencial de las universidades, generación de nuevo conocimiento, como atributo incondicional para retroalimentar los procesos docentes y de proyección a la sociedad. Se recomienda, como acción prioritaria, servicio de las Universidades a la comunidad, en especial para atender problemáticas relacionadas con la pobreza, la violencia, la convivencia, la intolerancia y, finalmente, se señala la necesidad de utilizar y de apoyar los procesos de formación superior con las tecnologías de la comunicación e información, instrumentos que han de contribuir con el mejoramiento de la calidad, con el acceso y con la cobertura de la educación superior.

Del 23 al 25 de junio de 2003, se llevó a cabo en París la reunión de seguimiento de la Conferencia Mundial de Educación Superior, denominada París + 5, a la cual no se le dio la connotación de reunión o conferencia de gobiernos, sino que se constituyó en un encuentro de expertos en el tema de la educación superior. En el informe general de la relatoría, se consagra a la educación superior como un bien público y se ratifica la necesaria autonomía de las Universidades, la libertad académica y el deber de los estados para garantizar el sustento y permanente fortalecimiento de las instituciones de edu-

cación superior. De manera contraria, se ha pretendido sustituir los conceptos anteriores por otros que conducen a interpretar a la educación superior como un “bien público global y como un servicio”, en oposición a lo considerado en los autorizados espacios académicos de todo el mundo. Conceptos que no tienen la posibilidad de conciliarse con los de una educación superior, como fuente de la innovación, la creatividad y el pensamiento crítico al servicio de las sociedades.

Resulta de significativa prioridad que las Universidades de América Latina y el Caribe, en el contexto de las anteriores realidades, inicien la preparación para la próxima Conferencia Mundial de Educación Superior, que desde ya viene programando la UNESCO, para el año 2009, en París y que, consecuentemente, por iniciativa de la Directora de UNESCO-IESALC, Doctora Ana Lucia Gazzola y el Director de ANDIFES (Asociación Nacional de Dirigentes de Instituciones Federales de Educación Superior, Brasil), Doctor Paulo Sélter (II Encuentro de Redes Universitarias y Consejos de Rectores de América Latina y el Caribe, Caracas, 3 y 4 de mayo de 2007) han impulsado, a nivel de la región y con el apoyo de una excelente nómina de consultores, la preparación del documento titulado “Tendencias de la Educación Superior en América Latina y el Caribe”, el cual, con una visión de futuro, propone los términos de referencia para establecer las políticas de Estado en la educación superior, la ciencia y la cultura. La Educación Superior para el Desarrollo Sostenible, se constituye en la idea central del trabajo, que bajo el análisis del contexto regional y mundial, en términos prospectivos, estudiará los retos y las oportunidades de la educación superior. Las tendencias propuestas son las siguientes: el papel de la Educación Superior en la construcción del conocimiento; la calidad, la pertinencia y la relevancia; la inclusión y la equidad; la diversificación, la diferenciación y la segmentación; la integración, la cooperación internacional, redes y asociaciones.

El análisis de las tendencias, se articulará a los problemas, retos y variables que caracterizan a la educación superior y que se enmarcan en las siguientes temáticas: Bajas tasas de matrícula; baja inversión en Ciencia y Tecnología; transnacionalización, comercio educativo y captación de recursos humanos a través de programas académicos desiguales y fuga de talentos.

Estudios complementarios y de apoyo deben de facilitar el análisis de las tendencias propuestas; es el caso del estudio comparativo de las legislaciones y de las reformas universitarias ocurridas en los últimos años; el estudio de los sistemas de evaluación, acreditación y certificación de la calidad y, finalmente, estudios relacionados con el gobierno, la gobernanza y la gobernabilidad en las instituciones.

Todo lo anterior constituye una apretada síntesis del trabajo que con la colaboración de todos los universitarios de la región hemos de emprender para analizar la real situación de nuestras Universidades y cómo estas realidades se insertaran en la educación superior de Colombia, que con toda responsabilidad hay que señalar NO es ajena a lo aquí resumido. Con la determinación que sea la ciudad de Cartagena, sede en el año 2008, se presentará una excelente oportunidad para liderar los preparativos de la reunión mundial.

La Universidad colombiana, se debe constituir en actor principal de la educación superior, ya que es ella, la organización llamada a liderar la reconstrucción nacional a partir de la defensa de los valores que orienten las acciones políticas y sociales que, con urgencia, demanda nuestro país. La formación en los diferentes niveles que ofrece la educación superior, no debe presumir que la calidad, sólo se debe referir a los aspectos académicos, sino que es imprescindible analizar las condiciones en las cuales se realiza el trabajo universitario. Las relaciones Universidad-Sociedad, desde sus realidades nacionales e internacionales, debe potenciar su acción transformadora, para concretar sus actividades centradas en temas relacionados con la paz, la promoción de la justicia y de los derechos humanos y la interculturalidad. Una reunión mundial de Educación Superior debe de movilizar a todos sus actores, con el único objetivo de atender los desafíos para transformar y renovar la sociedad contemporánea.

CONTAMINACIÓN POR ELEMENTOS MENORES Y POSIBLES SOLUCIONES

MINOR ELEMENT CONTAMINATION AND POSSIBLE SOLUTIONS

Rodrigo Lora Silva ¹

RESUMEN

En este artículo, se analizan algunos problemas causados por el exceso de los micronutrientes esenciales Fe, Cu, Mn, Zn, Ni, B, Mo y Cl, y otros elementos no esenciales para hombres y animales, como cadmio, plomo, cromo, arsénico y selenio. Se consideran los factores que afectan la solubilidad de estos elementos, como reacciones redox, reacción del suelo, complejos orgánicos, reacciones de precipitación, adsorción superficial y reacciones biológicas. Se examinan, igualmente, los síntomas visuales, el análisis foliar y el análisis de suelos, como herramientas de diagnóstico de la toxicidad de elementos menores. Finalmente, se hace referencia a las posibles soluciones a la contaminación y la toxicidad por microelementos, tanto de manejo preventivo como de recuperación.

Palabras clave: micronutrientes, contaminación, síntomas visuales, diagnóstico, recuperación.

SUMMARY

In this article the problems due to the excess of the essential micronutrients Fe, Cu, Mn, Zn, Ni, B, Mo and Cl are analyzed, as well as those caused by other non

essential elements such as cadmium, lead, chromium, arsenic and selenium. The factors that affect the solubility of these elements as redox reactions, soil reaction, organic complexes, precipitation reactions, superficial adsorption and biological reactions are considered. The visual symptoms, foliar and soil analysis are examined as tools to diagnose the micronutrients toxicity. Finally, reference is made of the possible solutions for contamination and toxicity of microelements for both preventive and recuperation management.

Key words: micronutrients, visual symptoms, diagnosis, contamination, recuperation.

INTRODUCCIÓN

Dentro de los elementos esenciales para la planta existen ocho que son requeridos en cantidades pequeñas, por lo cual, se les denomina elementos menores o micronutrientes. Estos elementos son el boro (B), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), níquel (Ni), molibdeno (Mo) y cloro (Cl). Existen algunos elementos cuya esencialidad no ha sido probada, pero cuya presencia en algunos casos produce efectos benéficos, tales como el silicio (Si), yodo (I) y sodio (Na); o en ciertos casos el elemento es necesario para que se efectúe un determinado proceso, tal como ocurre con el cobalto (Co), en la fijación simbiótica del nitrógeno. Igualmente, la planta puede tomar algunos elementos que no desempeñan ninguna función de beneficio, pero que pueden llegar a ser tóxicos para plantas y animales cuando se

¹ Ingeniero Químico, M.Sc. Docente Investigador, Carrera de Ingeniería Agronómica, U.D.C.A. Dirección para Correspondencia: Calle 222 No. 55-37, Bogotá, D.C.

sobrepasan ciertos límites. Tal es el caso del cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb), selenio (Se), arsénico (As) y cromo (Cr), entre otros (Lora, 1998; 2001; Brown *et al.* 1987; Marschner, 2003; Méndez *et al.* 2000; Luján, 2005; Reiman *et al.* citado por Matamoros, 2003). El riego con aguas contaminadas ha producido toxicidad de B, Cd, Pb y Cr, principalmente y ha afectado la salud de hombres y animales, en cuando se consumen cultivos sensibles o acumuladores, como cebolla, ajo, lechuga, remolacha, papas y nabos (Lucho *et al.* 2005).

Formas químicas de los micronutrientes que pueden ser absorbidas por las plantas:

Para conocer el problema de contaminación por exceso de micronutrientes en el medio de crecimiento de la planta, se requiere tener información relacionada con las formas químicas que pueden ser tomadas por ellas. De acuerdo con Munevar (1999), los cationes Fe, Cu, Mn, Z y Ni son tomados o absorbidos en forma iónica. Por su parte, los elementos B, Mo y Cl, la planta los absorbe en forma aniónica o en forma molecular, por tanto es importante tener en cuenta la química de los cationes y los aniones respecto a las propiedades químicas del suelo (Lora, 2003), lo cual puede permitir un manejo adecuado de la toxicidad.

La solubilidad de los micronutrientes está asociada con numerosas reacciones, entre las cuales se destacan:

Reacciones Redox: La disponibilidad de elementos como el Fe y el Mn está controlada en gran parte por reacciones de óxido reducción. Las formas oxidadas de estos elementos son poco solubles y por tanto no disponibles, en contraste con las formas reducidas. Factores como humedad y aireación controlan estas reacciones en el suelo e influyen en su disponibilidad y, en algunos casos, en el exceso o contaminación por parte de estos dos nutrientes. Recalca Lora (1999), que en el cultivo de arroz de riego o inundación juega papel importante este factor, especialmente para el Fe y el Mn, tal como ocurre en algunos suelos de los Llanos Orientales de Colombia.

Complejos Orgánicos: La materia orgánica (MO) forma compuestos estables con los iones metálicos, esto es, con el cobre, el manganeso, el hierro, el zinc y el níquel. La estabilidad de los complejos sigue el siguiente orden:



Los principales efectos de los agentes complejantes derivados de la materia orgánica corresponden a mantener en solución, como complejos solubles, elementos menores que de otra forma se precipitan, transformar micronutrientes de la fase sólida en formas solubles, servir como vehículo para el movimiento de estos elementos hacia la raíz y convertir, en formar no asimilables, micronutrientes que se hallan en el suelo. Además, los complejos orgánicos solubles pueden colaborar para que algunos micronutrientes contaminantes se pierdan por lixiviación o para inducir deficiencias de algunos micronutrientes esenciales para la planta (Matamoros, 2003; Wong *et al.* 2006).

La capacidad de los ácidos húmicos y fúlvicos para formar complejos estables con iones metálicos, se puede atribuir a su alto contenido de grupos funcionales que contienen oxígeno, tales como COOH⁻, OH⁻, fenólicos, alcohólicos y C=O. Los ácidos fúlvicos tienen pesos moleculares más bajos que los húmicos, por lo cual, se cree que cumplen función muy importante en el mantenimiento de los micronutrientes catiónicos en la solución del suelo. Los ácidos húmicos forman compuestos más insolubles (Burbano, 1998; Lora, 1999; Zapata, 2005).

Reacciones de Precipitación: La formación de precipitados insolubles es uno de los fenómenos que más afectan la disponibilidad de los micronutrientes. Estos precipitados incluyen óxidos, hidróxidos, fosfatos, carbonatos y molibdatos. En general, la solubilidad disminuye al aumentar el pH con excepción de los molibdatos. Algunos autores, como Lora (1999), Tisdale *et al.* (1993) y Barrera (2003), mencionan que puede también haber insolubilización por coprecipitación con compuestos como Al(OH)₃, CaCO₃ y Fe(OH)₃, quedando así el elemento ocluido fuera del alcance de la planta.

Adsorción Superficial: La adsorción superficial o retención en la superficie de coloides u otros materiales, depende del pH. En los cationes aumenta con el pH, mientras que la de los aniones disminuye, esto es, en condiciones de acidez, la adsorción aniónica puede ser elevada. La mayor adsorción del Cu y el Zn por la montmorillonita ocurre a pH neutro o alcalino bajo las formas de CuOH⁺ y ZnOH⁺, presentes a pH altos. A medida que aumentan las condiciones reductoras del medio, se presenta un incremento de los iones Fe⁺⁺ y Mn⁺⁺ y, por tanto, mayor absorción por parte de las plantas. Se debe tener en cuenta que si el pH es mayor que 7

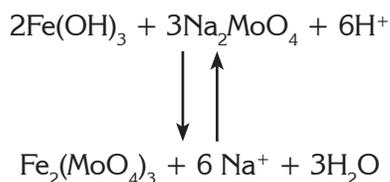
podría haber precipitación de hidróxidos de Fe y Mn, reduciéndose la disponibilidad de los dos nutrientes, como podría ocurrir en ciertas etapas de suelo inundado en arroz bajo riego.

Para B, la forma iónica adsorbida por los coloides del suelo es $B(OH)_4$, adsorbida principalmente por el $Al(OH)_3$. En general, las arcillas de tipo micáceo tienen gran habilidad para adsorber B, según la siguiente secuencia:

Vermiculita > Caolinita > Montmorillonita

El pH, al cual ocurre la máxima adsorción de B, es dependiente del coloide, así: 5,5 a 7,0 para Al_2O_3 , 7,0 para $Al(OH)_3$ y 8 a 9 para Fe_2O_3 y arcillas (Boyd & Knezek, citados por Lora, 1999).

La adsorción del anión molibdato, se puede deber a enlaces covalentes entre los iones molibdato y los hidróxidos superficiales de coloides, o por intercambio aniónico entre OH^- y MoO_4^- . Posteriormente, ocurre precipitación de molibdato de hierro o aluminio (Motta, 1976; Bohn *et al.* 2001; Fassbender, 1982), de acuerdo a la siguiente reacción:



De acuerdo con esta reacción es necesario un medio ácido para que ocurra la fijación de molibdeno. La capacidad de los coloides para adsorber el elemento sigue el siguiente orden:

Óxidos de Hierro > Óxidos de Aluminio > Halloisita > Nontronita > Caolinita

Reacciones Biológicas: Los procesos microbiológicos están involucrados en las reacciones que intervienen en la disponibilidad de los micronutrientes. Los microorganismos pueden afectar la disponibilidad de los elementos menores liberando iones inorgánicos durante la descomposición de la MO, esto es, durante la mineralización de los materiales orgánicos e inmovilizando los micronutrientes por incorporación en las estructuras microbiales. Además por oxidación, por

reducción y por ocasionar cambios del pH y/o potencial de óxido-reducción, afectando la forma y la solubilidad de los microelementos. Cualquier factor que afecte la actividad de los microorganismos estará igualmente articulado a la disponibilidad de los micronutrientes del suelo. En general, se reduce la actividad de las bacterias nitrificantes y la actividad de los microorganismos descomponedores de la MO. Entre estos factores, se destacan la reacción del suelo, los micronutrientes y los metales pesados, los macronutrientes, el contenido de agua del suelo, las condiciones de oxidación y de reducción, la temperatura y la materia orgánica, entre otros (Burbano, 1998; Lora, 2003, Kirilkaya *et al.* 2004; Frey *et al.* 2006; Dai *et al.* 2004).

En la Figura 1, aparecen las reacciones que afectan la concentración de micronutrientes en la solución del suelo. La mayoría de los nutrientes esenciales o no esenciales son afectados por estas reacciones con relación a concentración en la solución y, por tanto, a su disponibilidad para la planta que, en muchos casos, puede llegar a niveles tóxicos (Lindsay, 1973).

García (1998) menciona como factores para una aplicación racional de fertilizantes de elementos menores, la velocidad y la capacidad de reemplazo en la solución del suelo, la concentración en la solución del suelo, el movimiento de los nutrientes a la superficie de la raíz, el cual se realiza por el flujo de masa, la difusión y la interceptación radicular. Además, varios autores, como Brown *et al.* (1972), Mengel & Kirkby (1979), Lora (1994) y Tamayo & Hincapié (2002), indican que se deben tener en cuenta algunos factores que afectan la habilidad de la planta para tomar o absorber micronutrientes y entre estos, se pueden citar la atmósfera y la temperatura del suelo, el antagonismo iónico, las sustancias tóxicas, la actividad microbiana, los impedimentos mecánicos y la zona radicular.

La toxicidad es el resultado de la absorción de algún elemento y de su acumulación en una cantidad tal que causa daño en la planta. La magnitud del daño depende, según IFDC (1985), Marschner (2003) y Lora (2003), del tiempo, de la concentración, de la clase y del uso del agua y de la susceptibilidad del cultivo. Algunos pastos, híbridos de maíz y leguminosas, como la alfalfa, pueden tolerar situaciones elevadas de aluminio o altas cantidades de boro y cloro (Maas, citado por García, 1994).



Figura 1. Reacciones asociadas con la solubilidad de los micronutrientes (adaptado de Linsay, 1973)

Diagnóstico de la toxicidad por micronutrientes

Para diagnosticar problemas de toxicidad por micronutrientes, se requiere que la persona encargada de hacer el diagnóstico conozca el cultivo. Se deben considerar algunas características, tales como la rizofera, la temperatura, el pH, las plagas, las enfermedades, la humedad del suelo, los problemas de salinidad y sodicidad, los daños por herbicidas, la identificación y control de malezas, labranza, híbrido o variedad, la densidad de siembra, el manejo del agua, la época de siembra, la edad del cultivo y la fertilización donde se considere fuentes, dosis, método y época de aplicación de los fertilizantes (Molina & Frye, 1982; Tisdale *et al.* 1993; Lora, 1994; 2003; 2005; Mejía, 1998; Lora, 2005).

El conocimiento adecuado de las condiciones o factores antes mencionados, ayuda a determinar si la presencia de un problema está provocando deficiencia o toxicidad de uno o varios elementos. De esta manera, se puede determinar la deficiencia o la toxicidad de elementos menores o de elementos traza contaminantes en las plantas, utilizando herramientas de diagnóstico, tales como síntomas visuales, análisis foliar y análisis de suelos. Lo más recomendable es utilizar las tres, ya que ellas se complementan para realizar un diagnóstico más confiable (Marín, 1986; INPOFOS, 1993).

SÍNTOMAS VISUALES

La apariencia de una planta ha sido usada como una ayuda para determinar el estado de "salud" de ésta. Se

debe tener en cuenta que el síntoma no solo puede indicar deficiencia o toxicidad, sino también la presencia de una enfermedad, al ataque de plagas, problemas de heladas, toxicidad por herbicidas, viento, granizo o implementos de campo y a deficiencia o exceso de agua. Por tanto, no siempre es fácil determinar exactamente cuál es el problema que indica la planta con el síntoma. Para hacer un adecuado diagnóstico, se requiere estudio, experiencia y, sobre todo, conocer muy bien cuál es el aspecto de una planta saludable. Es necesario tener un amplio conocimiento de los problemas que afectan los cultivos y hacer una evaluación adecuada de los mismos. Para diagnosticar por síntomas deficiencias nutricionales, se debe conocer la localización de los síntomas de los elementos móviles e inmóviles. Los síntomas de toxicidad pueden aparecer en toda la planta o en las hojas viejas, primordialmente. Conforme a lo mencionado por Lora (1994), Medina (2003), Marschner (2003) y García (1998) es importante considerar los factores relacionados con la toxicidad de los micronutrientes, de la siguiente manera:

Boro: La toxicidad por boro puede llegar a ser un problema más grave que la deficiencia. Como lo mencionan Keren & Bingham (1985), Turner (1978), Lora (1989), Garavito & León (1978), García *et al.* (1999) y Lora *et al.* (2002a) podría existir toxicidad en suelos de regiones áridas o semiáridas que reciben aguas de drenaje provenientes de sedimentos marinos ricos en boro, en suelos regados con agua con más de 0,5ppm de boro para cultivos susceptibles y más de 4ppm para cultivos tolerantes, en suelos altamente fertilizados con boro y en suelos salinos o sódicos. El aguacate, el ciruelo y la vid son sensibles. Alfalfa, repollo, papa y tabaco son semitolerantes; algodón, remolacha y ajonjolí son tolerantes.

Cobre: Jiménez (1983), Ortiz (1998), Matamoros (2003) y Mejía (1998) mencionan la ocurrencia de toxicidad en suelos arenosos podzólicos bajos en MO, la acumulación de cobre por uso continuo de fungicidas a base del elemento o por fertilización continua con el elemento; igualmente en suelos ricos en cobre por actividades urbanas e industriales (Abbas *et al.* 2006).

Hierro: El Fe puede causar problemas, como lo afirman Marschner (2003), Escobar (1985), Castillo (1985), Acosta (2003) y Bernal & Gómez (2004), en oxisoles o ultisoles ricos en hierro y bajos en manganeso, bajo

condiciones reducidas, como en arroz de riego, en suelos ácidos a fuertemente ácidos o debido a la aplicación continua y dosis elevadas de fertilizantes de hierro.

Manganeso: Grandett (1979), García (1981), Villar & Lora (1992), Bernal & Triana (1980), Acosta (2003), Guerrero & Burbano (1979) y García (1998) consideran las condiciones reducidas, como en arroz de riego, la fertilización continua con manganeso, los suelos ácidos y además con bajo contenido de Fe, los altos contenidos de manganeso total y cambiante y la aplicación continua de fungicidas con manganeso, como características que favorecen la toxicidad por Mn. Contenidos iguales o mayores de 150ppm en el suelo redujeron el rendimiento y la calidad de la fresa (Casierra & Poveda, 2005).

Molibdeno: De acuerdo a Motta (1976), Jiménez (1983), Lora *et al.* (2004), Agreda *et al.* (1992), Lora (1978) e Higuera & Lora (1979), la toxicidad de Mo se manifiesta en suelos alcalinos orgánicos, en suelos derivados de deposiciones volcánicas recientes, en suelos esqueléticos de colina derivados de arcillolitas y areniscas, bajo la presencia de pizarras. Además, a causa de la aplicación continua de fertilizantes de molibdeno y en suelos ya sea con elevados contenidos de fósforo u orgánicos pobremente drenados, se puede presentar toxicidad.

Zinc: Gutiérrez (1974), Lora *et al.* (2002b) y Marschner (2003) mencionan la posible toxicidad en suelos ácidos o ligeramente ácidos, en turbas ácidas, en suelos contaminados con zinc de operaciones mineras o derivados de rocas y materiales altos en Zn. Consideran también la aplicación continua y elevada de fertilizantes de Zn y la continua aplicación de plaguicidas que contienen el microelemento, como causa de la toxicidad. Según resultados obtenidos por Casierra & Poveda (2005), alrededor de 350ppm de Zn reducen el rendimiento y la calidad de fresa. El uso de lodos de albañal y aguas costeras contaminadas con Zn y metales pesados incrementó a niveles tóxicos su concentración en varios cultivos (Muchaweti *et al.* 2006)

Cloro: La toxicidad, se manifiesta en suelos salinos con exceso de cloruros, en suelos neutros o alcalinos, en suelos de zonas áridas o semiáridas o con influencia marina. Además, ocurre al emplear agua de riego rica en cloruros, más de 10me/L y al fertilizar con cloruros de los cationes K, Ca, Mg, NH_4^+ y materiales ricos en cloruros (García, 1998; Lora, 1998; Tisdale *et al.* 1993; Marschner, 2003).

Níquel: Brown *et al.* (1987) y Marschner (2003) mencionan, como condiciones de toxicidad, la aplicación de lodos y aguas de albañal y el bajo contenido de calcio y magnesio. En cebada, la fuente de níquel guardó relación con la fitotoxicidad y la concentración, cultivo en el cual Molas *et al.* (2004) encontraron que la absorción fue mayor a partir de $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de citrato o de EDTA.

Síntomas de toxicidad:

A continuación, se anotan algunos síntomas generales de toxicidad para algunos de los micronutrientes:

Manganeso: García (1998) y Marschner (2003) mencionan clorosis o necrosis marginal que aparece primero en las hojas más viejas, como en alfalfa, maní, trébol dulce; manchas intervenales pardas o café, rodeadas por una zona clorótica, como en cebada; hojas cloróticas con manchas necróticas y de tamaño reducido, como en tabaco y, hojas pequeñas y quebradizas, como en el algodón. Estos autores demostraron, además, la pérdida de dominancia apical y proliferación de chupones axilares, como en el cacao y la aparición de síntomas de deficiencia de otros elementos, como Ca, Fe y Mg. También mencionan problemas foliares, tales como hojas pequeñas, verde claras con bordes amarillentos en el café, hojas nuevas con puntos pardos en las nervaduras finalmente amarillentas, como en soya y frijol y hojas con manchas amarillentas entre las nervaduras, seguido de puntos pardos que se pueden juntar, como en el trigo. El efecto típico de la fitotoxicidad de Mn es una disminución exponencial en el crecimiento al incrementar la concentración de manganeso por encima del nivel crítico.

Cobre: Los síntomas de toxicidad por cobre, se manifiestan por hojas viejas con manchas acuosas y después pardas y negras, falta de crecimiento de hojas y muerte de raíces, como en el café (INPOFOS, 1993); por la inhibición del crecimiento de la raíz y por la producción de síntomas de deficiencia de hierro (Marschner, 2003).

Zinc: La clorosis de las hojas nuevas, debido a deficiencia inducida de hierro es síntoma típico de toxicidad de Zn. Además en suelos de texturas gruesas, el exceso de zinc induce deficiencias de cobre en cebada, avena y trigo, principalmente (Lora, 1999; García, 1998).

Molibdeno: Marschner (2003), Motta (1976) e Higuera & Lora (1979) coinciden en mencionar como síntomas la deformación de las hojas y decoloración amarilla dorada en los brotes y una deficiencia de hierro.

Boro: Síntomas de toxicidad, se manifiestan por clorosis o necrosis o ambas en los márgenes y en los ápices de hojas maduras. En plantas monocotiledóneas, se presenta necrosis en los ápices y no en las márgenes, mientras que en las dicotiledóneas, se observa tanto necrosis marginal, como apical (Keren & Bingham, 1985; Marschner, 2003; IFDC, 1985).

Hierro: Para este micronutriente, Escobar (1985), Bernal & Gómez (2004) y Salisbury & Ross (1994) indican, como síntomas, un anaranjamiento de las hojas de algunas variedades de arroz; eventualmente estas hojas se secan y la planta aparece como chamuscada (quemada); las panículas no se desarrollan y las raíces son pardas, gruesas y a veces espesas. Además, la toxicidad acentúa los síntomas de deficiencia de manganeso y de fósforo.

Cloro: Necrosis de los ápices de las hojas que progresan a lo largo de las márgenes y la caída temprana de las hojas cuando la toxicidad es muy elevada. Otros síntomas son parecidos a los ocasionados por problemas de salinidad (García, 1998; Marschner, 2003).

EL ANÁLISIS FOLIAR

Aunque el término indica análisis de "hojas", se refiere al análisis cuantitativo del contenido de un elemento en toda la parte aérea de la planta o en parte de ella. La parte comúnmente empleada para este análisis es la hoja o parte de ella. El análisis foliar permite el diagnóstico o confirmación de síntomas visuales, identificar la denominada "hambre escondida", indicar si los nutrientes aplicados vía foliar o edáfica han sido tomados, indicar interacciones o antagonismos entre nutrientes, evaluar el estado nutricional a través del tiempo y sugerir análisis o estudios adicionales para identificar problemas en una zona determinada (INPOFOS, 1993; Malavolta, 1994; Lora, 1998). El análisis foliar que envuelve a los elementos B, Cu, Fe, Mn, Zn y Mo, generalmente es más útil en cultivos perennes que en cultivos anuales.

Para que el análisis foliar sea realmente una herramienta útil, se deben tener en cuenta los siguientes aspectos:

Toma y preparación de muestras: Las muestras deben ser representativas del área y estar constituida por un número suficiente de submuestras, el cual puede ser calculado usando la fórmula de Peterson & Calvin (1965) que dice:

$$N = \text{Ta}^2\text{S}^2 \times 1/D$$

donde: N = No. de submuestras; $T_a = T$ de Student con $(n-1)$ grados de libertad y "a" nivel de probabilidad; $S^2 =$ Varianza, y D = Límite específico de precisión.

El tipo de material, la edad más adecuada de la planta y el número de submuestras es muy importante. En la Tabla 1, se menciona información relevante para el muestreo en algunos cultivos (Malavolta, 1994; Howeler, 1985; Lora, 1970). En relación con la preparación de la muestra es conveniente tener en cuenta las siguientes consideraciones (Lora, 1998; Bornemiza, 1978): evitar pérdidas por respiración y descomposición (almacenar a 2-3°C); emplear un adecuado cuarteo para muestras representativas, tanto antes como después de la molien-

da; ejecutar una molienda adecuada (0,4-0,8mm), en un molino de acero inoxidable; realizar un adecuado lavado, secado (60-75°C por 24-48 horas), almacenamiento y evitar contaminación durante el proceso de análisis.

Análisis químico de las muestras: Existen varias metodologías. Para los elementos Fe, Cu, Mn y Zn, la digestión vía húmeda. Los nutrimentos se cuantifican por espectrofotometría de absorción atómica; para molibdeno, se incluye el horno de grafito. Para boro, se hace digestión seca, las cenizas se disuelven en ácido y el elemento se determina colorimétricamente (Lora, 1998; Vargas *et al.* 2002; IFDC, 1985; Camelo *et al.* 1992).

Tabla 1. Muestreo para análisis foliar en algunos cultivos (Malavolta, 1994; Howeler, 1985; Lora, 1970).

CULTIVO	ÉPOCA	PARTE DE LA PLANTA	NÚMERO DE HOJAS/ha
Arroz	Época media macollamiento	Lámina foliar hoja "Y"	30 - 35
Maíz	Iniciación barbas o cabello	Hoja opuesta a la mazorca principal	30 - 35
Frijol	Inicio de la floración	Lámina foliar primera hoja madura	30 - 35
Papa	Inicio botón floral	Pecíolo de la cuarta hoja a partir del cogollo	30 - 45
Yuca	Tres - cuatro meses de edad	Lámina foliar primera hoja completamente expandida	30 - 35
Palma Africana	Inicio estación seca preferencialmente	Foliolos medios de la hoja 17 o de la hoja 9 según la edad	30 - 35
Algodón	Inicio de la floración	Lámina de hojas en la axila de la "manzana"	30 - 35
Tomate de Mesa	Floración	Cuarta hoja a partir del cogollo	40 - 45
Leguminosas Forrajeras	Inmediatamente antes de la floración	Toda la parte aérea	30 - 35

Nivel crítico: El nivel crítico de deficiencia es el contenido del elemento en la muestra por debajo del cual se espera una respuesta significativa a la aplicación del elemento. El nivel crítico de toxicidad hace referencia al contenido del elemento por encima del cual la planta sufre por toxicidad del elemento y, por tanto, hay reducción en el rendimiento. En general, el nivel adecuado o suficiente está entre el nivel de deficiencia y de toxicidad. En la Tabla 2 aparecen las concentraciones de micronutrimentos en algunos cultivos (Howeler, 1985; Malavolta, 1994) para tres niveles. Esta información es a nivel general, ya que en muchos casos puede haber diferencia entre variedades e híbridos dentro de la misma especie; por este motivo, se requiere determinar los niveles críticos de toxicidad por zonas y por cultivos. Por ejemplo, para maíz, niveles en hojas de boro, manganeso, hierro,

cobre y zinc superiores a 35, 200, 350, 50 y 100ppm, respectivamente, se han determinado en suelos localizados en zona tropical con temperaturas elevadas y precipitaciones frecuentes (Howeler, 1985). Al presentar el cultivo presenta exceso de micronutrimentos, el desarrollo, en algunos casos, se restringe y los rendimientos se pueden reducir significativamente. El manejo de los micronutrimentos debe ser cuidadoso para evitar problemas de toxicidad. En muchos casos es más grave la toxicidad que la deficiencia.

EL ANÁLISIS DE SUELOS

El análisis de suelos tiene como propósito caracterizar el recurso suelo para tomar decisiones sobre el uso de fertilizantes y enmiendas y conocer si existe deficiencia o toxicidad de algunos elementos para así hacer el manejo

Tabla 2. Concentración de micronutrientes para los niveles deficiente, normal y tóxico para algunos cultivos (Howeler, 1985).

CULTIVO	PARTE DE LA PLANTA	EPOCA	ESTADO NUTRICIONAL *	ppm				
				B	Mn	Fe	Cu	Zn
Maíz	Hoja opuesta a la mazorca principal	Iniciación cabello	D<	2	15	10	2	10
			N	10	85	135	13	45
			T>	35	200	350	50	100
Arroz	Lámina foliar hoja "Y"	Mitad macollamiento	D<	3	20	70	6	10
			N	50	120	250	15	35
			T>	100	2500	300	30	1500
Frijol	Lámina foliar primera hoja madura	Inicio floración	D<	15	20	100	15	15
			N	25	140	400	20	45
			T>	45	200	700	30	90
Yuca	Lámina foliar primera hoja expandida	Tres - cuatro meses de edad	D<	20	45	100	5	25
			N	45	80	130	8	20
			T>	100	250	200	15	120

D = Deficiente N = Normal T = Tóxico

pertinente (Lora, 1998). Los objetivos del análisis de elementos menores del suelo son separar áreas deficientes de áreas no deficientes, determinar la probabilidad de respuesta rentable a la aplicación de micronutrientes, tanto por rendimiento como por calidad, evaluar la productividad del suelo y determinar las condiciones del suelo que pueden ser mejoradas mediante prácticas de cultivo y adición de enmiendas.

Toma de muestras: Dada la heterogeneidad de factores de suelo que afectan la disponibilidad de micronutrientes es recomendable tomar suficiente número de submuestras para constituir una muestra. Un estimativo de las submuestras a tomar, se puede derivar de la fórmula propuesta por Peterson & Calvin (1965), tal como se explicó para el análisis foliar. La profundidad de muestreo generalmente se recomienda a 20cm, pero se puede llegar hasta 40cm dependiendo del cultivo. Para evitar contaminaciones no se debe emplear hierro galvanizado, bronce, latón o caucho en el equipo de muestreo o en los recipientes donde se coloca la muestra. El acero inoxidable o algunos tipos de plástico pueden ser recomendables.

Determinación de los micronutrientes: De acuerdo con Lora (1998) las bases químicas para el análisis de

los micronutrientes corresponden a los factores de intensidad y de capacidad, que afectan la disponibilidad del nutrimento para la planta y, por tanto, deben ser reflejados en un análisis de suelos: a los extractantes ácidos para suelos ácidos, a los extractantes básicos para suelos neutros o alcalinos y a agentes quelatantes y complejantes para micronutrientes catiónicos. Debido a que la cantidad de micronutrientes intercambiables es muy baja, muchos extractantes contienen ácidos, bases, agentes complejantes, que disuelven también otras formas de nutrimento y así se tiene una medida adecuada de la capacidad del suelo para suministrar los micronutrientes a la planta. Importante tener en cuenta algunas consideraciones relacionadas con los extractantes y las extracciones simultáneas, como acetato de amonio – EDTA para Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Co; DTPA para Zn, Fe, Mn, Cu; bicarbonato de sodio para Fe, Cu, Mn, Zn, y bicarbonato de sodio más DTPA para microcationes.

Nivel crítico: El nivel crítico hace referencia al contenido o rango por debajo del cual la probabilidad de obtener bajos rendimientos es elevada y por encima la respuesta a la aplicación del elemento es adecuada. Existe un nivel crítico de toxicidad por encima del cual hay disminución en calidad y en rendimiento. Para que los análisis tengan utilidad es necesario hacer la calibración de los métodos

analíticos, para lo cual, preferencialmente, se deben emplear los estudios de campo donde se correlaciona el rendimiento con la cantidad extraída y determinada, o en su defecto la cantidad o la concentración foliar

con lo extraído del suelo por la solución extractora bajo estudio. En la Tabla 3 aparecen los niveles críticos para algunos cultivos de acuerdo al extractante utilizado en la determinación de los micronutrientes.

Tabla 3. Niveles críticos de elementos menores en el suelo (Lora, 1998).

ELEMENTO	EXTRACTANTE	NIVEL (PPM)*	CULTIVO
Boro	Agua Caliente	B < 0,6 T > 0,8	Papa
		B < 0,2 T > 0,4	Hortalizas
	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ 0,08M	B < 0,4 T > 0,6	Papa
		B < 0,25 T > 0,40	Sorgo
Cobre	NaHCO ₃ 0,5 N + EDTA 0.05 M (pH 8,5)	B < 1,0 T > 2,0	General
	HCl 0,05 N + H ₂ SO ₄ 0,025 N	B < 0,5 T > 1,0	Pastos
Manganeso	NaHCO ₃ 0,5 N + EDTA 0.05 M (pH 8,5)	B < 5,0 T > 8,0	General
	HCl 0, 5 N + H ₂ SO ₄ 0,025 N	B < 5,0 T > 8,0	Fríjol y Soya
Hierro	NaHCO ₃ 0,5 N + EDTA 0,05 M (pH 8,5)	B < 25 T > 50	General
	HCl 0,1 N	B < 0,5 T > 1,5	Maíz Hortalizas
Zinc	NaHCO ₃ 0,5 N + EDTA 0.1 M (pH 8,5)	B < 1,5 T > 3,0	General
	HCl 0,05 N + H ₂ SO ₄ 0,025 N	B < 0,5 T > 1,0	Pastos
		B < 0,8 T > 1,5	Soya y Fríjol
Molibdeno	Oxalato ácido de amonio (pH 3,3)	B < 0,10 T > 0,20	General
Cloro	Extracto de saturación	B < 5me/L T > 6me/L	Aguacate, tabaco, fresa
		B < 15me/L T > 20me/L	Cítricos, uva, frutales de hueso

B = Bajo T = Tóxico

ELEMENTOS TRAZA

Dentro de los elementos traza algunos son esenciales para la planta, como lo es el caso de los micronutrientes. Algunos son tóxicos si se acumulan en el suelo o en los tejidos foliares, como ocurre con el cadmio, el mercurio, el plomo, el arsénico, el cromo, el flúor, el vanadio y el selenio. El empleo de aguas negras y agua

de riego de mala calidad puede conllevar cantidades tóxicas de elementos traza a suelos y plantas y, por tanto, a animales y el hombre. En la Tabla 4, se presentan las concentraciones permisibles de elementos traza en aguas de riego (García, 1998; Alfaro *et al.* 2002; Matamoros, 2003; Matamoros *et al.* 1999).

Tabla 4. Máximas concentraciones permisibles de elementos traza en el agua de riego (García, 1998; Matamoros, 2003)).

ELEMENTO	MÁXIMA CONCENTRACIÓN (mg/L)	ELEMENTO	MÁXIMA CONCENTRACIÓN (mg/L)
Arsénico (As)	0,10	Manganeso (Mn)	0,20
Cadmio (Cd)	0,01	Molibdeno (Mo)	0,01
Cromo (Cr)	0,10	Níquel (Ni)	0,20
Cobre (Cu)	0,20	Plomo (Pb)	5,0
Flúor (F)	1,0	Selenio (Se)	0,02
Hierro (Fe)	5,0	Zinc (Zn)	2,0
Litio (Li)	2,5		

POSIBLES SOLUCIONES A LA CONTAMINACIÓN POR MICROELEMENTOS

En general es más difícil recuperar un suelo que presenta exceso de micronutrientes en forma disponible, que cuando hay deficiencia. Por este motivo es importante conocer el suelo y el cultivo, para llevar a cabo prácticas preventivas que reduzcan la posibilidad de toxicidad. Entre éstas están las siguientes: caracterizar el estado de disponibilidad del elemento para aplicar solo la cantidad requerida de acuerdo al cultivo; emplear aguas de riego de buena calidad que tengan niveles bajos de elementos menores; no utilizar materiales ricos en elementos menores, como aguas negras, lodos de albañal, aguas ricas en B, Se o Mo; no emplear fertilizantes orgánicos ricos en elementos menores, especialmente si la dosis a aplicar es elevada. Suelos regados con agua del río Bogotá en su cuenca alta han mostrado contenidos elevados de Pb, Ni, Cr, Co y vanadio, potencialmente tóxicos para la salud pública y animal al ingerir productos agrícolas que han crecido en estos suelos (Matamoros *et al.* 1999). La contaminación por exceso de Cr procedente de las curtimbres puede ser tóxica para hombres y animales

que consuman el material vegetal contaminado. La elevación del pH o la aplicación de yeso puede reducir el problema (Álvarez *et al.* 2006).

El Se es un elemento esencial para los animales pero no para las plantas. La máxima cantidad de Se en el agua para riego es de 0,020ppm; para el consumo humano y animal, se recomienda solo hasta 0,01ppm (Lora *et al.* 1998). En Colombia, se presentan problemas de aguas altas en Se que deben ser tratadas para reducir la concentración del elemento hasta niveles no tóxicos, por medio de un procedimiento que incluye la reducción de los selenatos a selenitos y arrastre de éstos con gel de hidróxido férrico; el contenido de selenio se elimina a niveles no tóxicos, esto es menores de 0,007ppm.

El Se y el Mo, por encima de ciertos niveles, son tóxicos y pueden producir seleniosis y molibdenosis en animales y en humanos que ingieran productos vegetales ricos en estos elementos. En el país existe el problema en suelos influenciados por sedimentos del Cretáceo (formación Villeta o equivalentes) (García *et al.* 1999; Mejía & Oso-

rio, 1983; Puentes & Rodríguez, 1983). Para reducir el problema, se ha investigado con el empleo de sulfato de calcio, cloruro de calcio y sulfato de amonio. En suelos procedentes del municipio de Sutamarchán, se redujo la concentración de molibdeno en avena variedad ICA-Cajicá de 32ppm a 21ppm, con la aplicación de 1000kg/ha de cualquiera de los materiales sulfato de calcio, cloruro de calcio o sulfato de amonio (Puentes & Rodríguez, 1983).

Por su parte, en suelos seleníferos del municipio de Puerto Boyacá, a orillas del río Negro y derivados de la Formación Villeta, se determinó el efecto de dosis variables de cloruro de calcio, sulfato de calcio, cloruro de bario y sulfato de bario sobre la concentración de selenio en el pasto Ryegrass (*Lolium multiflorum*). Los resultados muestran que la aplicación de 500-750kg/ha de cualquiera de los materiales redujo la concentración de selenio en el pasto a niveles inocuos para animales y humanos (Torres *et al.* 1978). Por ser de un costo más bajo y por la facilidad de adquisición en el mercado, las sales de calcio pueden ser muy promisorias para el manejo del problema.

En suelos seleníferos procedentes de Útica (Cundinamarca), se determinó el efecto en la reducción de la absorción de selenio por dosis variables de sulfato de calcio y cloruro de calcio, por parte de las especies maíz híbrido ICA-H-211, frijón variedad Diacol Calima, avena variedad ICA-Cajicá y pasto Angleton. Las dosis empleadas de cada uno de los compuestos fueron 0, 400, 800, 1200, 1600kg/ha. En general, se observó efecto inhibitorio de la absorción de selenio en las cinco especies (Mejía & Osorio, 1983), tal como se ve en la Tabla 5. Empleando el mismo suelo utilizado en este estudio, se evaluó, bajo condiciones de casa de malla, el efecto de las mismas fuentes y dosis variables sobre la concentración de selenio en la espiga de trigo variedad Sugamuxi. Se inhibió la concentración de selenio a niveles inferiores a 5ppm, consideradas no tóxicas con el empleo de sulfato de amonio y sulfato de calcio, debido posiblemente al bloqueo en la absorción de selenio por el trigo a causa de las emiendas aplicadas.

El pH es uno de los factores que tiene más efecto en la disponibilidad para la planta de los elementos menores y pesados. Sin embargo, el único elemento menor cuya

Tabla 5. Efecto de dosis y fuentes de calcio y sulfato de amonio en la concentración de selenio en cuatro especies vegetales (Mejía & Osorio, 1983).

Fuentes	Se (ppm)				
	Dosis	Maíz	Frijol	Avena	Angleton
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	19,50	21,10	18,70	18,80
	400	16,00	16,50	14,00	12,40
	800	11,00	13,90	13,00	9,60
	1200	4,10	5,40	9,80	8,00
	1600	3,70	3,15	10,00	9,00
CaSO ₄	0	19,50	21,10	18,70	18,80
	400	10,50	21,00	12,00	12,00
	800	10,20	15,80	9,30	11,30
	1200	8,50	5,40	9,70	8,30
	1600	5,70	5,20	9,40	8,00
CaCl ₂	0	19,50	21,10	18,70	18,80
	400	14,20	15,70	11,70	14,90
	800	11,00	14,40	8,70	13,60
	1200	3,30	11,10	6,00	7,00
	1600	3,70	4,90	6,70	7,00

disponibilidad para la planta se incrementa al elevar el pH es el Mo. Bajo este contexto puede ser recomendable lo expresado a continuación para controlar o, por lo menos reducir, el exceso de contenido disponible de los micronutrientes (Lora, 1994; Brown *et al.* 1972; García, 1998; Bohn *et al.* 2001; Gyana, 2003; Lora, 2001).

Boro: Aplicación de cal hasta pH de 6,50; incrementar el nivel de Ca y K.

Molibdeno: Reducir el pH a niveles de 4,5-5,0 o usar fertilizantes amoniacales o azufre elemental pulverizado; aplicación de yeso o de sulfato de amonio (efecto del azufre).

Hierro : Encalamiento a pH de 7,0; fertilización con potasio; empleo de variedades tolerantes del cultivo; fertilización fosfórica elevada.

Manganeso: Encalamiento a pH de 6,0-6,5; aplicación elevada de magnesio; aplicación elevada de fósforo; empleo de genotipos tolerantes; aplicación elevada de materia orgánica.

Cobre: Encalamiento a pH de 6,5-7,0; incrementar el nivel de nitrógeno; incorporación de materia orgánica.

Zinc: Incrementar el pH por encima de 6,5 por encalamiento; complejamiento con ácidos húmicos y fúlvicos; fertilización fosfórica elevada.

Níquel y Cromo: Especialmente en suelos influenciados por serpentina puede ser adecuado el encalamiento hasta pH alrededor de 6 a 7 (Marschner, 2003).

Cadmio y Plomo: El encalamiento o la aplicación de tierra diatomácea activada puede reducir la toxicidad de estos elementos (Méndez *et al.* 2000). Por su parte, la aplicación de sulfato de hierro o sulfato de aluminio puede reducir la toxicidad de arsénico (Liebig, 1966). La fitorremediación con plantas con buena tolerancia al exceso de metales pesados puede ser una opción para suelos contaminados. Zhelgazcov *et al.* (2006) encontraron, por ejemplo, que la composición y presencia de Cd, Pb, y Cu no fue significativo para el contenido de aceites esenciales de menta, eneldo y basilico.

Selenio: El sulfato de amonio o el sulfato de Ca reducen la concentración del elemento hasta niveles no tóxicos en varios cultivos (Mejía & Osorio, 1983).

Finalmente, suelos sulfatados con exceso de Mn, Fe y S pueden ser recuperados por encalamiento y posterior lavado con drenajes adecuados y utilizando avena como cultivo; después de la avena se puede utilizar el terreno para siembras de algunas hortalizas y pastos (Gómez *et al.* 2005).

BIBLIOGRAFÍA

- ABBAS, S.; SARFAZ, M.; MEHDI, S.; HASSAN, G.; RE-DHMMAN, O. 2006. Trace elements accumulation in soil and rice plants irrigated with contaminated water. *Soil Tillage Res.* (in press).
- ACOSTA, A. 2003. Evaluación de la disponibilidad de elementos menores en algunos suelos de la serie Río Bogotá. Trabajo de Grado. Ing. Agrónomo. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Bogotá, D.C. 140p.
- AGREDA, L.; OTERO, D.; ORTEGA, J. 1992. Disponibilidad de micronutrientes bajo bosque y pradera en suelos de la llanura del Pacífico, Dept. de Nariño. *Suelos Ecuatoriales.* 12(1):14-23.
- ALFARO, R.; GARCÍA, E.; MONTENEGRO, O. 2002. Niveles de contaminación de mercurio, cadmio, arsénico y plomo en subsistemas de producción de la cuenca baja del Río Bogotá. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 4(2):66-71.
- ÁLVAREZ, D.; CONTRERAS, S.; TRUJILLO, N.; FRÍAS, F.; OLALDE, V. 2006. Effects of tanneries on chemical and biological soil characteristics. *Appl. Soil Ecol.* 33:269-277.
- BARRERA, L. 2003. El papel de la materia orgánica en el manejo integral de la fertilidad del suelo. En: Soc. Col. de la Ciencia del Suelo. Manejo integrado de la fertilidad del suelo. Edit. Guadalupe Ltda. (Bogotá). p.123-134.
- BERNAL, C.; TRIANA, P. 1980. Disponibilidad de micronutrientes en cuatro suelos de clima frío de Cundinamarca y Boyacá. Tesis Químico. U.N. de Colombia, Bogotá. 260p.
- BERNAL, H.; GÓMEZ, R. 2004. Comportamiento de la papa criolla (*Solanum phureja*) a la aplicación de Fe, Cu, Zn, B y Mo en suelos de la serie Bermeo.

- Trabajo de Grado Ing. Agrónomo. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Bogotá. 117p.
- BOHN, H.; McNEAL, B.; O'CONNOR, G. 2001. Soil Chemistry. 3rd Ed. John Wiley and Sons Inc. N.Y. 307p.
- BORNEMIZA, E. 1978. Metodología para la investigación de problemas de micronutrientes. Suelos Ecuatoriales. 9(2):148-154.
- BROWN, J.; AMBLER, E.; CHANLEY, L.; FOY, C. 1972. Different responses of plant genotypes to micronutrients. En: Dinauer, R. Micronutrients in Agriculture. Soil Sci. Soc. of Am. Inc., Madison, Wisconsin. p.389-418.
- BROWN, P.; WELCH, M.; CARY, E. 1987. Nickel: a micronutrient essential for higher plants. Plant Physiol. 85:801-803.
- BURBANO, H. 1998. Interacciones de la materia orgánica y los elementos menores. En: Memorias Curso Actualidad y futuro de los micronutrientes en la agricultura. Soc. Col. de la Ciencia del Suelo. Pro-labo Ltda. Santa Fe de Bogotá, D.C. p.31-47.
- CAMELO, D.; ROJAS, A.; YUNDA, A. 1992. Evaluación de métodos para la extracción de boro disponible en suelos. Suelos Ecuatoriales. 12(1):310-327.
- CASIERRA, F.; POVEDA, J. 2005. La toxicidad por Mn y Zn disminuye la calidad y rendimiento en fresa. Agron. Colomb. 23(2):283-289.
- CASTILLO, E. 1985. Disponibilidad de micronutrientes en cinco suelos de la cuenca media del río Suárez (Santander y Boyacá). Tesis M.Sc. Progr. de Estudios para Graduados ICA-UN. Bogotá. 188p.
- DAI, J.; BECQUER, T.; ROUILLER, J.; REVERSAT, F.; LAVELLE, P. 2004. Influence of heavy metals on C and N mineralization and microbial biomass in Zn, Pb, Cu and Cd contaminated soils. Appl. Soil Ecol. 95:99-109.
- ESCOBAR, R. 1985. Disponibilidad de micronutrientes en suelos de los Llanos Orientales. Tesis M.Sc. Progr. de Estudios para Graduados ICA-UN. Bogotá. 113p.
- FASSBENDER, H. 1982. Química de suelo con énfasis en suelos de América Latina. Elementos menores. Inst. Interam. de Cooperación para la Agricultura. San José de Costa Rica. p.362-390.
- FREY, B.; STEMMER, M.; WIDMER, F.; LUSTER, J.; SPERISEN, Ch. 2006. Microbial activity and community structure of a soil after heavy metal contamination in a model forest ecosystem. Soil Biol. Biochem. 38:1745-1756.
- GARAVITO, F.; LEÓN, A. 1978. Propiedades del suelo en relación con deficiencias de boro en el Valle del Cauca. Suelos Ecuatoriales. 9(2):105-201.
- GARCÍA, B. 1981. Disponibilidad de elementos menores en cuatro suelos del municipio de Villeta. Tesis M.Sc. Progr. de Estudios para Graduados ICA-UN. Bogotá. 132p.
- GARCÍA, A. 1998. Efectos tóxicos de los micronutrientes y otros elementos. En: Memorias Curso Actualidad y futuro de los micronutrientes en la agricultura. Soc. Col. de la Ciencia del Suelo. Santa Fe de Bogotá, D.C. p.13-31.
- GARCÍA, A. 1994. Diagnóstico y control de la fertilidad en suelos afectados por sales y sodio. En: Soc. Col. de la Ciencia del Suelo. Fertilidad de suelo, diagnóstico y control. Edit. Guadalupe Ltda. Bogotá, D.C. p.469-506.
- GARCÍA, C.; CABRERA, D.; MEJÍA, L.; ROJAS, A. 1999. Evaluación del contenido de selenio y molibdeno en suelos y pastos de dos fincas ganaderas de Puerto Salgar (Cundinamarca) y sus posibles efectos en la población pecuaria. Suelos Ecuatoriales. 29(2):150-155.
- GÓMEZ, I.; CASTRO, H.; PACHECO, W. 2005. Recovery and management of actual acid and sulphate soils in Boyacá, Colombia. Agron. Colomb. 23(1):128-135.
- GRANDETT, G. 1979. Disponibilidad de manganeso en cuatro series de suelos de la Sabana de Bogotá.

- Tesis M.Sc. Progr. de Estudios para Graduados ICA-UN. Bogotá. 115p.
- GUERRERO, R.; BURBANO, H. 1979. Fracciones de azufre y niveles críticos para la planta en suelos de los Llanos Orientales y la Sabana de Bogotá. Suelos Ecuatoriales. 10:232-244.
- GUTIÉRREZ, D. 1974. Fertilización del maíz H-302 confósforo y zinc en el oriente de Cundinamarca. Tesis M.Sc. Progr. de Estudios para Graduados ICA-UN. Bogotá. 107p.
- GYANA, R. 2003. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I- Zinc. *Agronomie (Francia)*. 23:3-11.
- HIGUITA, F.; LORA, R. 1979. Respuesta de la coliflor a la aplicación de cal y molibdeno. *Agric. Trop. (Colombia)*. 20(11):638.
- HOWELER, R. 1985. Análisis foliar en el diagnóstico de problemas nutricionales. En: Curso Suelos y fertilización de cultivos. Soc. Col. de la Ciencia del Suelo. Neiva. p.37-61.
- INTERNATIONAL FERTILIZER DEVELOPMENT CENTER IFDC. 1985. Micronutrients in tropical food crop production. Ed. Vleck, P. Muscle Schools, Alabama (EEUU). 260p.
- INSTITUTO DE LA POTASA Y EL FÓSFORO INPOFOS. 1993. Diagnóstico del estado nutricional de los cultivos. Quito. Ecuador. p.55.
- JIMÉNEZ, J. 1983. Disponibilidad de cobre, manganeso y molibdeno en el Valle de Ubaté-Chiquinquirá y su relación con los nitratos en la planta. Tesis M.Sc. Progr. de Estudios para Graduados ICA-UN. Bogotá. 74p.
- KEREN, R.; BINGHAM, J. 1985. Boron in water, soils and plants. En: *Advances in Soil Science*. Vol. 1. Edit. Springer Verlag N.Y. p.229-226.
- KIRILKAYA, R.; AZKIN, T.; BAYRAKLI, B.; SAGLAN, M. 2004. Microbiological characteristics of soils contaminated with heavy metals. *Europ. J. Soil Biol.* 40:95-102.
- LIEBIG, G. 1966. Arsenic. En: University of California. Diagnostic criteria for plants and soils. Edit. Chapman H. p.13-23.
- LINDSAY, W. 1973. Inorganic phase equilibrio of micronutrients in soils. *Micronutrients in Agricultura*. SSSA, Madison, Wisconsin. p.41-57.
- LORA, R. 1970. Análisis foliar. Técnicas de muestreo y preparación de material para análisis químico. Instituto Colombiano Agropecuario ICA, Bogotá. 24p.
- LORA, R. 1978. Respuesta de los cultivos de clima frío a la aplicación de micronutrientes. En: Ed. Silva, F. Memorias del V Eloquentio de suelos. Potasio y micronutrientes en la agricultura colombiana. Suelos Ecuatoriales. 9(2):183-191.
- LORA, R. 1989. Factores que afectan la disponibilidad de azufre y elementos menores. En: Memorias Curso de actualización sobre suelos y fertilizantes. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. C.I. Tibaitatá. Bogotá. p.129-153.
- LORA, R. 1994. Factores que afectan la disponibilidad de nutrimentos para las plantas. En: Soc. Col. de la Ciencia del Suelo. Fertilidad de Suelos. Diagnóstico y Control. Santa Fe de Bogotá, D.C. p.29-57.
- LORA, R. 1998. Análisis de suelos y material vegetal para micronutrientes. En: Soc. Col. de la Ciencia del Suelo. Actualidad y futuro de los micronutrientes en la agricultura. Edit. Prolabo Ltda. Santa Fe de Bogotá, D.C. p.47-56.
- LORA, R.; MELO, T.; RODRÍGUEZ, J. 1998. Recuperación de aguas seleníferas. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. (Bogotá)* 1(2):77-85.
- LORA, R. 1999. Dinámica del azufre y los micronutrientes. En: Ciclo de cursos de actualización de conocimientos con aplicación en palma africana de aceite. CENIPALMA. Santa Fe de Bogotá, D.C. p.93-109.
- LORA, R. 2001. El silicio en la agricultura, con énfasis en la producción de arroz. En: Soc. Col. de la Ciencia

- del Suelo. Los elementos secundarios y el silicio en la agricultura. p.125-135.
- LORA, R.; ÁVILA, O.; RODRÍGUEZ, A. 2002a. Respuesta de la papa criolla a fuentes y dosis de boro en un Andisol de Cundinamarca. Suelos Ecuatoriales. 32:23-28.
- LORA, R.; RAMÍREZ, J.; OLIVAR, A.; CABEZAS, M. 2002b. Respuesta de tres variedades de arroz a la aplicación de zinc en Villanueva (Casanare). Suelos Ecuatoriales. 32:1-6.
- LORA, R. 2003. Las propiedades químicas del suelo y su fertilidad. En: Soc. Col. de la Ciencia del suelo. Manejo integral de la fertilidad del suelo. Edit. Guadalupe. Bogotá. p.31-42.
- LORA, R. 2005. Efecto residual de la fertilización. En: Memorias Primer taller nacional sobre suelos. Fisiología y nutrición en papa. Cevipapa. Bogotá. p.83-86.
- LORA, R.; TORRES, J.; BOLAÑOS, R. 2004. Disponibilidad de micronutrientes en cuatro localidades de la serie Bermeo. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 7(1):91-100.
- LORA, R.; MONTAÑEZ, I.; BERNAL, H.; GÓMEZ, R. 2006. Evaluación de la aplicación de Fe, Cu, Mn, Zn, B y Mo en papa criolla en un Andisol de Cundinamarca. Suelos Ecuatoriales. 36:1-5.
- LÚCHO, C.; PRIETO, F.; DEL ROZO, M.; RODRÍGUEZ, R.; PAGGI, H. 2005. Chemical fractionation of boron and heavy metals in soils irrigated with wastewater in central Mexico. Agric. Ecos. Environm. 108:57-71.
- LÚJÁN, M. 2005. El intrigante cadmio. Cátedra de química biológica vegetal. Universidad de Buenos Aires. 5p.
- MALAVOLTA, E. 1994. Diagnóstico Foliar. En: Soc. Col. de la Ciencia del Suelo. Fertilidad de Suelos. Diagnóstico y Control. Santa Fe de Bogotá. p.57-99.
- MARIN, G. 1986. Fertilidad de suelos con énfasis en Colombia. Instituto Agropecuario de Colombia ICA, Bogotá. 193p.
- MARSCHNER, H. 2003. Mineral nutrition of higher plants. Function of nutrients: micronutrients. Diagnosis of deficiency and toxicity of mineral nutrients. Edit. Acad. Press. San Diego, California (EEUU). p.313-404 y 461-469.
- MATAMOROS, A.; VARGAS, O.; MEJÍA, L. 1999. Especiación química del Pb, Ni, Cr, Cu, Cd y V en dos suelos naturales y en un Andisol agrícolas, contaminados por riego con las aguas del río Bogotá en su cuenca alta. Suelos Ecuatoriales. 29(2):143-185.
- MATAMOROS, A. 2003. Suelos contaminados por metales traza. En: Soc. Col. de la Ciencia del Suelo. Manejo integral de la fertilidad del suelo. Edit. Guadalupe Ltda. Bogotá. p.111-119.
- MEDINA, A. 2003. Síntomas de deficiencias minerales en las plantas. En: Soc. Col. de la Ciencia del Suelo. Manejo integral de la fertilidad del suelo. Edit. Guadalupe Ltda. Bogotá. p.23-30.
- MEJÍA, J.; OSORIO, F. 1983. Inhibición de la absorción de selenio en trigo, maíz, frijol, avena y Angleton. Tesis I. A. U. N. Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá, D.E. 148p.
- MEJÍA, J. 1998. Degradación de suelos y cultivos por contaminación con elementos traza y pesados derivados de diversas fuentes en Colombia. En: Soc. Col. de la Ciencia del Suelo. Encuentro Nacional de Labranza de Conservación. Edit. Guadalupe Ltda. Bogotá. p.97-144.
- MÉNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, L.; PALACIOS, S. 2000. Impacto del agua de riego con aguas contaminadas, evaluado por la presencia de metales pesados en suelos. Terra Latinoam. (México). 18(4):277-288.
- MENGEL, K.; KIRKBY, A. 1979. Principles of plant nutrition. Edit. Internacional Potash Institute, Berna (Suiza). 593p.
- MOLINA, G.; FRYE, C. 1982. Selección de métodos químicos para la evaluación de elementos menores en suelos aldoneros de Colombia. Suelos Ecuatoriales. 12(1):200-211.

- MOLAS, F.; BARAN, S. 2004. Relationship between the chemical form of nickel applied to the soil and the uptake and toxicity to barley plants. *Geoderma*. 122:247-255
- MOTTA, B. 1976. Efecto de dos métodos de fertilización con molibdeno en el rendimiento de la coliflor en un suelo de la serie Mosquera. Tesis M.Sc. Programa de Estudios para Graduados ICA-UN. Bogotá. 88p.
- MUCHAWETI, M.; BIRKETT, J.; CHINYANGA, E.; LESTER, J. 2006. Heavy metal content of vegetables irrigated with mixtures of waste water and sewage sludge in Zimbabwe. *Agric. Ecos. Environ.* 112:41-48.
- MUNÉVAR, F. 1999. Revisión de conceptos básicos sobre el suelo. En: *Memorias: Ciclo de cursos de actualización de conocimientos con aplicación en palma africana de aceite*. CENIPALMA. Santa Fe de Bogotá, D.C. p.4-23.
- ORTIZ, G. 1998. Fertilización de la soya con micronutrientes en suelos del Valle del Cauca. Ed. Selon, F. *Actualidad y futuro de los micronutrientes en la agricultura*. 2ª ed. Prolabo Ltda. Palmira. p.157-171.
- PETERSON, R.G.; CALVIN, L.D. 1965. Sampling. In: Black, C.A. *et al.* (Ed.) *Methods of soil analysis*. Am. Soc. Agronomy (EEUU). p.54-72.
- PUENTES, G.; RODRÍGUEZ, C. 1983. Determinación de molibdeno en un inceptisol de Sutamarchán e inhibición de su absorción en Avena sativa L. Tesis Químico. Facultad de Ciencias. U. N. Colombia. Bogotá, 149p.
- SALISBURY, F.; ROSS, C. 1994. *Fisiología Vegetal*. Grupo Edit. Interamericana S.A., México. 759p.
- TAMAYO, A.; HINCAPIÉ, M. 2002. Micronutrientes en cítricos y relación con su contenido en suelos de Caicedonia, Valle del Cauca. En: *Resúmenes X Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo*. Medellín. Soc. Col. de la Ciencia del Suelo. p.21-24.
- TISDALE, S.; NELSON, W.; BEATON, J. 1993. *Soil fertility and Fertilizers*. Edit. McMillan Co. N.Y. p.350-413.
- TORRES, C.; JIMÉNEZ, M.; LORA, R. 1978. Determinación de selenio en suelos y material vegetal e inhibición de su absorción en Ryegrass (*Lolium multiflorum*). *Suelos Ecuatoriales* 9(2):218-223.
- TURNER, J. 1978. Boron in agricultura. U.S. Borax a member of RTZ group. N.Y. 41p.
- VARGAS, C.; BALLESTEROS, I.; TRIANA, P. 2002. Evaluación de extractantes para la determinación de boro disponible en suelos. *Suelos Ecuatoriales*. 32:84-89.
- VILLAR, H.; LORA, R. 1992. Disponibilidad de elementos menores en algunos suelos tabacaleros de Santander. *Suelos Ecuatoriales*. 12(1):310-327.
- WONG, J.; LI, K.; ZHON, L.; SELVAM, A. 2006. The sorption of Cd and Zn by different soils in presence of dissolved organic matter from sludge. *Geoderma*. (in press).
- ZAPATA, R. 2005. Función de la materia orgánica sobre la movilidad iónica. *Suelos Ecuatoriales*. 35(1):23-35.
- ZHELYAZKOV, V.; CRAKER, L.; XING, B. 2006. Effects of Cd, Pb and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint, and basil. *Environm. Exp. Bot.* 58:9-16.

Recibido: Julio 26 de 2006

Aceptado: Marzo 1 de 2007

MECANISMOS DE PATOGÉNESIS BACTERIANA EN PROCESOS RESPIRATORIOS: PASTEURELLOSIS

MECHANISMS OF BACTERIAL PATHOGENESIS IN RESPIRATORY PROCESSES: PASTEURELLOSIS

Paula Esquinas Castillo ¹

Carlos Iregui Castro ²

RESUMEN

Pasteurella multocida es un patógeno multiespecies que causa serias enfermedades en animales de producción, animales silvestres, de laboratorio y en los seres humanos. Esta bacteria es el agente etiológico de enfermedades, como el cólera aviar en pollos y pavos, septicemia hemorrágica en bovinos, rinitis atrófica en cerdos e infecciones en humanos por mordeduras de gatos y de perros. Este agente es responsable por pérdidas anuales de cientos de millones de dólares en producción animal solo en Estados Unidos. En los conejos *P. multocida* puede ser un patógeno virulento induciendo cuadros desde septicemia fatal, neumonía, rinitis crónica, otitis media, así como abscesos diseminados. En esta especie, se presenta un síndrome respiratorio, en el cual, frecuentemente, se aísla también *Bortetella bronchiseptica*, sin embargo aun no se ha determinado el papel que desempeña cada una de estas bacterias o algunos de sus factores de virulencia como el LPS en la inducción de la enfermedad. *P. multocida* es un cocobacilo Gram negativo donde se han identificado varios factores de virulencia, como la cápsula, la sialidasa, la hemaglutini-

nina filamentosa, la fimbria, la neuraminidasa, algunas porinas, la toxina dermonecrótica, la toxina termolabil (PMT), las proteínas de membrana externa (OMP) y el LPS. La falta de prevención eficaz y control de esta clase de enfermedades hace necesario la investigación de la patogénesis de este tipo de bacterias y sus interacciones con el hospedero.

Palabras clave: *Pasteurella multocida*, patogénesis, factores de virulencia, lipopolisacárido.

SUMMARY

Pasteurella multocida is a multispecies pathogen that causes serious diseases in wild and laboratory animals and in human beings. This bacteria is the etiologic agent of diseases such as fowl cholera in chicken and turkey, hemorrhagic septicemia in cattle, atrophic rhinitis in swine and infections in humans by cat and dog bites. This agent is responsible for annual losses of hundreds of millions of dollars in animal production, only in United States. In the rabbit *P. multocida* can be a virulent fatal pathogen inducing septicemia, pneumonia, chronic rhinitis, otitis as well as abscesses. In this species a respiratory syndrome appears in which frequently *Bortetella bronchiseptica* is also isolated. However the role of each of these bacteria or some of their virulence factors, like LPS, in the induction of the disease has not been determined. *P. multocida* is a Gram negative cocobacilo with several identified virulence factors, like capsule, sialidase, filamentous hemagglutinin, flagelum, neuraminidase, some

¹ MV, M.Sc.(c), Grupo de Investigación en Patobiología Veterinaria, Maestría en Salud y Producción Animal, Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Universitaria, pcesquinasc@unal.edu.co, Bogotá, Colombia.

² MV. DMV. Director Grupo de Investigación en Patobiología Veterinaria, Departamento de Patología, Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Universitaria, caireguic@unal.edu.co, Bogotá, Colombia.

porins, dermonecrotic toxin, termolabil toxin (PMT), outer membrane proteins (OMP) and LPS. The lack of effective prevention and control of this type of diseases makes a research of the pathogenesis of the bacteria and its interactions with the host necessary.

Key words: *Pasteurella multocida*, pathogenesis, virulence factors, lipopolysaccharide.

INTRODUCCIÓN

En general, las patologías inducidas por bacterias Gram negativas tienen un impacto muy importante sobre los animales de producción sometidos a altas densidades y por ende a mala calidad del ambiente (Meyer, 1991; Bonilla & García-Delgado, 1993; Murtaugh *et al.* 1996). Dentro de estas enfermedades, las entidades respiratorias son consideradas como causantes de grandes pérdidas económicas en distintas especies animales (Andrews & Kennedy, 1997; Bureau *et al.* 2001). En bovinos, aves y cerdos se han demostrado pérdidas anuales de millones de dólares tanto por muertes como por bajas en la producción (Coy *et al.* 1997; Griffin, 1997; Brockmeier & Register, 2000). En conejos, reiteradamente, se muestra una estrecha asociación entre *Pasteurella multocida* con diversas patologías (Flatt & Dungworth, 1971a y b; DiGiacomo *et al.* 1983; Deeb *et al.* 1990; Kpodekon *et al.* 1999). Si bien todas las formas de presentación reportadas tienen algún grado de significancia económica, son las formas respiratorias (rinitis y neumonía) y la forma sistémica (septicemia) las de mayor impacto negativo en los planteles dedicados a la explotación comercial (Chengappa *et al.* 1986), así como en animales criados para laboratorio (DiGiacomo *et al.* 1983; Barnum, 1990; Frost & Adler, 2000). En general, se sostiene que la *P. multocida* es el patógeno más frecuentemente aislado de las entidades arriba descritas en conejo. Sin embargo, igualmente se reportan aislamientos simultáneos de *Bordetella bronchiseptica* (Flatt & Dungworth, 1971a y b; Deeb *et al.* 1990; Moreno, 1995), especialmente en las afecciones respiratorias; no obstante, el papel que juega cada una de ellas durante los procesos infecciosos no ha sido claramente definido. La *P. multocida* y la *B. bronchiseptica* son consideradas parte de la flora normal de las vías aéreas superiores en conejos; sin embargo, factores ambientales macro, como el clima y el ambiente de los galpones y factores micro, como el ambiente de las mucosas de las vías

aéreas, favorecerían su virulentación y patogenización en el hospedero (Bonilla & García-Delgado, 1993; Deeb & DiGiacomo, 2000).

La prevalencia de la infección con *P. multocida* varía dependiendo de la edad, el sexo y el estado sanitario de los conejos. DiGiacomo *et al.* (1983) demostraron cómo en general la infección natural con *P. multocida* aumentó en un 4% en conejos de 12 semanas a un 23% en conejos de 22 semanas y hasta en un 72% en conejos adultos. Huertas & Iregui (1996) reportaron que los animales a los 49 días de edad tenían un periodo crítico en el cual sufrían la enfermedad más frecuentemente; sin embargo, en este estudio no fue posible discriminar si la infección era debida a *P. multocida*, *B. bronchiseptica* o a ambas. En un estudio realizado en una granja de la Sabana de Bogotá, se realizaron aislamientos en conejos sanos de distintas edades comenzando desde neonatos hasta animales enfermos, se encontró que la *B. bronchiseptica* se aislaba prácticamente de cualquier animal sano después de los 21 días de edad y, en el 80% de los enfermos, mientras que la presencia de *P. multocida*, se limitaba a los conejos enfermos, aislándose en el 49% de los animales con signos de la enfermedad (Moreno, 1995).

Poco se conoce acerca de la patogénesis de las enfermedades inducidas por *P. multocida*. Una de las razones es la ausencia de un modelo experimental reproducible (Dowling *et al.* 2002). En general existen muy pocos estudios dirigidos a entender la epidemiología y las bases moleculares de la virulencia de las cepas asociadas con las enfermedades inducidas por estos patógenos en las diferentes especies animales (Davies *et al.* 2004).

ENFERMEDAD RESPIRATORIA DE LOS CONEJOS

Aunque no se ha determinado claramente cual es el conjunto de factores que predisponen el inicio de la enfermedad, se considera que la edad de los conejos es un punto clave en el desarrollo de ésta. Generalmente, los gazapos son infectados por la madre, posteriormente, la resistencia natural disminuye y la inmunidad de tipo pasivo va decayendo, observándose un aumento notable en la morbilidad después de las ocho semanas (Sánchez *et al.* 2000). En las hembras, las mucosas oral, conjuntival y vaginal parecen ser la principal vía de ingreso de la bacteria (Kpodekon *et al.* 1999; Deeb & DiGiacomo, 2000). Algunos autores reportan que éstas

resultan ser más susceptibles, generalmente debido a la manipulación a que son sometidas como reproductoras (Sánchez *et al.* 2000).

Estudios serológicos e inmunohistoquímicos han demostrado un comportamiento variable de los anticuerpos en animales que sobreviven a la enfermedad. La respuesta de IgM se da desde el primer día de detección de signos hasta los días 14 - 21 y tiene caída precipitada hacia el día 28; para IgG, la respuesta es más tardía, iniciando el día siete aproximadamente, hasta el día 28 (Glass & Beasley, 1989; Takashima *et al.* 2001).

El complejo respiratorio de los conejos tiene varias formas de presentación. En los casos septicémicos predomina la fiebre, polipnea, disnea, cianosis de las mucosas y orejas y dilatación abdominal; algunos animales pueden morir sin síntomas aparentes (Glavits & Magyar, 1990; Kpodekon *et al.* 1999). El cuadro respiratorio es la forma más común, tal vez por ser la más visible. Las vías aéreas superiores son las más frecuentemente involucradas (rinitis, sinusitis y traqueitis), se observa el pelo del hocico y de las extremidades anteriores húmedos como consecuencia de la descarga de un exudado mucopurulento y de los frecuentes estornudos, signos que pueden llegar a evolucionar hasta cuadros crónicos en los que finalmente se desarrolla destrucción de los cornetes nasales (Kpodekon *et al.* 1999). La conjuntivitis es una manifestación común de la enfermedad de las vías aéreas altas y obedece a infección por la contigüidad de los conductos nasolagrimales (Deeb & DiGiacomo, 2000). El curso hacia el tracto respiratorio bajo, se manifiesta clínicamente por fatiga, sonidos estertorosos en la traquea, dificultad respiratoria, cianosis de orejas y mucosas. A la auscultación, se puede detectar porciones del pulmón con sonidos ausentes muy probablemente por la presencia de abscesos (Deeb & DiGiacomo, 2000).

En la forma rinítica hay un pequeño exudado nasal hasta descarga nasal franca, mal estado general, depresión, anorexia y muerte (Al-Haddawi *et al.* 1999; Kpodekon *et al.* 1999; Deeb & DiGiacomo, 2000). La forma pleuroneumonía es la fase final de evolución de la forma respiratoria inferior y se caracteriza por hiperemia, disnea y por ser rápidamente mortal (Kpodekon *et al.* 1999).

Pasteurella multocida: En general, se sostiene que es el patógeno más frecuentemente asociado con entidades,

como mastitis, otitis, neumonía, rinitis y sinusitis en conejo; sin embargo, se reportan aislamientos simultáneos de *B. bronchiseptica*, especialmente, en las afecciones respiratorias (Deeb *et al.* 1990; Moreno, 1995). No obstante, el papel que desempeña cada uno de estos microorganismos durante los procesos infecciosos respiratorios no ha sido claramente definido (Flatt & Dungworth, 1971a y b; DiGiacomo *et al.* 1983; Deeb *et al.* 1990; Kpodekon *et al.* 1999).

La *P. multocida*, una especie heterogénea encapsulada de bacterias Gram negativas es un organismo comensal de muchas especies animales (Harper *et al.* 2003). Bajo condiciones predisponentes, es el agente etiológico de un amplio rango de infecciones económicamente importantes en animales domésticos (Davies *et al.* 2004). El patógeno es un cocobacilo bipolar, no motil, oxidasa (+), catalasa (+), indol (+) ó (-), del cual se han descrito cinco tipos capsulares (A, B, D, E y F) y 16 serotipos somáticos (Carter, 1988). Posee factores que contribuyen a su virulencia, cuya expresión obedece, a su vez, a la expresión de genes involucrados con la biosíntesis, metabolismo y adquisición de nutrientes necesarios para la bacteria, los cuales proporcionarían información acerca de la interacción con el hospedero, durante la cual el microorganismo activaría señales de inducción génica que, finalmente, mediarían en los mecanismos de sobrevivencia e invasión a otros sitios anatómicos del hospedero (Hunt *et al.* 2001).

En el conejo solo las propiedades antigénicas o de serotipo no son suficientes para caracterizar las cepas de pasteurellas bien sea según su capacidad patogénica o según su origen epidemiológico; las cepas de un mismo serotipo pueden tener patogenicidad diferente. Rideaud & Coudert (1992) han demostrado que las cepas sin la enzima ornitina-decarboxilasa (ODC), cualquiera que sea el diámetro de la colonia, son poco o nada patógenas; este criterio es más fiable que la medida de la colonia para prever la patogenicidad de las cepas independientemente de las condiciones de cultivo (Rideaud & Coudert, 1992; Kpodekon *et al.* 1999).

Factores de virulencia: Se describen varios factores de virulencia aún no bien caracterizados, entre los cuales están el polisacarido capsular, el lipopolisacarido, la proteína externa de membrana ligadora de hierro, la proteasa, la neuraminidasa y la porina (Rideaud & Coudert, 1992; Boyce & Adler, 2000). Chen *et al.* (2003) han

propuesto, más recientemente, el sistema de metilación de la adenina, el cual regula la expresión de un gen de virulencia denominado Dam en esta bacteria, al igual de lo demostrado en otras Gram negativas.

La estructura capsular determina el serotipo de la bacteria. Los polisacáridos son el mayor componente de ella y, en algunos casos, están acompañados de lipoproteínas. En el serotipo A, la cápsula esta compuesta en su mayoría de ácido hialurónico sensible a la acción de la enzima hialuronidasa, lípidos y proteínas. La cápsula no exhibe por sí sola propiedades antifagocíticas, ya que no tiene propiedades antigénicas, pero el extracto capsular bacteriano contiene un factor proteico (300kD) capaz de inhibir los fagocitos bovinos (Seleim, 1996, Watt *et al.* 2003). Las cápsulas de las cepas aviarias proveen protección contra la acción del complemento pero esto no determina la relación del organismo con las células fagocíticas, encontrándose igualmente reacción inflamatoria. Existen diferentes resultados en cuanto a la mayor o menor adhesividad o mayor susceptibilidad a la fagocitosis al ser retirada la cápsula (Champlin *et al.* 2002; De-Angelis *et al.* 2002).

En conejos, los aislamientos más frecuentes de *P. multocida* en cuadros respiratorios son los serotipos A y D (DiGiacomo *et al.* 1989, Borkowska-Opacka *et al.* 1995), de los antígenos somáticos 3 y 12 (Flatt & Dungworth, 1971a; Brodgen *et al.* 1989; Manning, 1982; Borkowska-Opacka *et al.* 1995). Se han descrito características más específicas para algunas de las variedades anteriores, por ejemplo, las cepas del grupo A:3 son capsuladas, poseen fimbria, no hemaglutinan el grupo sanguíneo O humano y no producen toxina dermonecrótica; mientras las del serotipo D:1 son acapsulares, poseen fimbria, hemaglutinan el grupo sanguíneo O humano y producen toxina dermonecrótica (Al-Haddawi *et al.* 2000).

Las cepas del serotipo A son más adhesivas a la superficie mucosa del hospedero que las del serotipo D aunque ambas poseen fimbrias que expresan en su membrana (Glorioso *et al.* 1982; Deeb & DiGiacomo, 2000). La presencia de fimbrias fue demostrada en *P. multocida* aislada de células faringicas de conejo, células tonsilares y nasales de cerdo, y nasales y traqueales de terneros. La adhesión de *P. multocida* del serotipo A es inhibida por la N-acetil D-glucosamina; se sugiere que este amino-azúcar sería el receptor de las células del hospedero, al cual se une la fimbria de la bacteria. Algunos resultados han

confirmado el papel de la fimbria y/o el material capsular en los procesos de adherencia utilizando anticuerpos contra ambas estructuras, aquellos inhibieron específicamente la capacidad de adherencia del microorganismo (Seleim, 1996; Esslinger *et al.* 1994). Investigaciones en porcinos muestran que algunas cepas del serotipo A son más adhesivas y no tienen necesariamente la capacidad de colonizar la mucosa nasal normal, por lo tanto, describen una pobre correlación entre la presencia de fimbria y la producción experimental de rinitis atrófica en cerdos (Esslinger *et al.* 1994).

En *P. multocida*, tipo D, las hemaglutininas son cruciales en colonización de la nasofaringe y traquea en cerdos, jugando la fimbria y la toxina dermonecrótica un papel significativo (Boyce & Adler, 2000). La toxina termolabil (PTM), igualmente involucrada con procesos respiratorios severos, es una proteína citoplasmática con un peso molecular entre 149 y 160 KD, se le ha demostrado principalmente en cepas del tipo capsular D y algunas toxigénicas del tipo A (Suckow *et al.* 1996).

Las proteínas de membrana externa (OMP) de las bacterias Gram negativas son la interfase entre el patógeno y el hospedero y juegan un papel esencial en la interacción inicial de estos en los procesos de enfermedad. Dentro de las anteriores, se menciona la proteína ligadora de hemoglobina, por intermedio de la cual la bacteria captura el hierro en ambientes escasos del mismo en forma libre. Este es uno de los elementos esenciales en las rutas metabólicas de transporte de electrones del patógeno. Mientras que algunos microorganismos liberan sideroforos para quelar el hierro libre, la *P. multocida*, principalmente las cepas patogénicas, expresan en su superficie la proteína, permitiendo su interacción con el sustrato. La proteína ligadora de hemoglobina está conformada por dos subunidades TbpA y TbpB para la transferrina y LbpA y LbpB para lactoferrina; son codificadas por un grupo de tres genes (box ton B) que al sufrir ligeras variaciones en la secuencia, aumentarían la variabilidad y, por ende, la evasión a la respuesta inmune (Confer *et al.* 2001; Bosch *et al.* 2002).

Los aislamientos de *P. multocida* varían en su habilidad para producir enfermedad en animales. Algunas están asociadas principalmente con enfermedades del tracto respiratorio alto mientras que otras pueden causar septicemia, abscesos y neumonía. Con el objeto de producir infección la bacteria puede colonizar la mucosa

respiratoria y los organismos que pueden realizar esta colonización frecuentemente producen sialidasas. Estas enzimas han mostrado una actividad glicolítica sobre las mucinas, la cual libera los residuos de ácido siálico terminales para ser usados como fuente de carbono por la bacteria. La sialidasa es una enzima glicolítica únicamente extracelular producida por la *P. multocida*, sugiriendo que esta enzima probablemente juega un papel central en la habilidad de la *P. multocida* para colonizar las mucosas. Muchos aislamientos poseen dos genes de silaidasas que codifican enzimas con diferentes especificidades de sustrato, por ejemplo, algunas cepas mutantes deficientes en sialidasas tienen una habilidad reducida para replicarse usando los glicoconjugados, como fuentes de carbono. La expresión de la sialidasa ha mostrado ocurrir durante la infección, más aun es probable que el huésped haya sido expuesto a la proteína durante la colonización de la bacteria (Sánchez *et al.* 2004).

Lipolisacarido: El lipopolisacárido (LPS) es el componente más abundante en la cápsula de las bacterias Gram negativas, considerado como uno de los más importantes productos bacterianos dotado con propiedades inmunomodulatorias y proinflamatorias, reconocido ampliamente como determinante de virulencia y es, tal vez, el mediador más importante del shock endotóxico (De Boer *et al.* 1992). El LPS es un mediador entre la bacteria y el hospedero y favorece la colonización e infección a través de mecanismos, como mimetismo molecular, variaciones antigénicas y bloqueo de anticuerpos (Harvill *et al.* 2000).

Durante la infección por bacterias Gram negativas, el LPS estimula el sistema inmune innato, haciendo que la respuesta inflamatoria juegue un papel crítico en la ayuda de la limpieza de la bacteria y prevención de la infección. Esta respuesta inicial contra las bacterias Gram negativas puede ser iniciada por un amplio número de componentes bacterianos, siendo más potente el lípido A. Si la respuesta inicial del hospedero es incapaz de limpiar la bacteria y la infección toma su curso, las grandes cantidades sistémicas de LPS pueden resultar en shock endotóxico, en el cual, una sobreproducción de mediadores inflamatorios, causan daño a los tejidos, shock séptico, falla orgánica y muerte (Raetz & Whitfield, 2002).

Específicamente, se considera que el LPS de la *P. multocida* juega un rol importante en la patogénesis de la

enfermedad, como uno de los más importantes factores de virulencia (Michael *et al.* 2005). Recientemente, se ha mostrado que el LPS de *P. multocida* está involucrado en la adhesión de neutrófilos al endotelio y la transmigración de éstos a través de las células endoteliales (Galdiero *et al.* 2000). El estudio de varias cepas de *P. multocida* aisladas de distintas especies animales confirmó que el LPS de esta bacteria es ligeramente similar al de las Enterobacteriaceas (Horadagoda *et al.* 2001). Cepas de pasteurellas provenientes de cerdos con rinitis atrófica (serotipo capsular D) mostraron, por lo menos, seis diferentes tipos electroforéticos de LPS y estos frecuentemente coincidían con la presencia de ciertas OMP y la presencia o ausencia de carácter patogénico de la cepa, por lo tanto, se considera que en las OMP y el LPS son un factor de virulencia que se encuentra ligado y responde a la activación de un mismo grupo de genes. Sin embargo, existen reportes contradictorios acerca de la capacidad endotóxica del LPS de *P. multocida*. Por ejemplo, el LPS aislado del serotipo B2 muestra ser endotóxico y al ser administrado intravenosamente es capaz de reproducir los signos clínicos de la septicemia hemorrágica en búfalo (Horadagoda *et al.* 2001). Una modificación en la estructura de LPS claramente afecta la viabilidad de la *P. multocida* in vivo. La modificación genética del ensamblaje del LPS de *P. multocida* comprobó que cepas con LPS truncados son menos virulentas e incapaces de sobrevivir en el hospedero natural (Harper *et al.* 2003).

Existen diferencias de susceptibilidad entre especies animales aun con el mismo LPS, así los pavos son relativamente resistentes a los efectos letales del LPS del serogrupo A, aunque la reacción inflamatoria y las lesiones hepáticas microscópicas son similares a las de los hospederos mamíferos. En contraste, los embriones de pollo y de ratones han demostrado ser altamente susceptibles a los efectos tóxicos del LPS de *P. multocida* (Ganfield *et al.* 1976). La respuesta en ratones y en conejos inoculados con LPS de *P. multocida* purificado es muy pobre en cuanto a la formación de anticuerpos y, por lo tanto, no ofrece protección contra la pasteurellosis. El mismo LPS inyectado en pollos induce buena respuesta de anticuerpos y produjo protección pasiva contra la enfermedad (Ramdani & Adler, 1991).

Anticuerpos reactivos a LPS de cepas del serotipo A3 han mostrado protección parcial contra la infección en conejos y ratones. El LPS parece igualmente jugar un

papel implícito en la protección contra el serotipo B. Se demostró que el LPS estimula la liberación de TNF- α , interleukinas y muchos otros factores de los macrófagos alveolares, los cuales mostraron tener acción mitogénica. La acción mitogénica fue explicada a través del daño en los mecanismos de las células del hospedero, liderados por la proliferación celular y el bloqueo de la apoptosis (Bienhoff *et al.* 1992; Horadagoda *et al.* 2001; Lax & Thomas 2002).

Efecto de la *P. multocida* y su LPS sobre epitelio respiratorio: El complejo Pasteurella-Bordetella es un modelo representativo de enfermedad respiratoria, en la cual, los microorganismos y/o sus toxinas (lipopolisacárido) se pueden diseminar en el hospedero. La *P. multocida* es un organismo comensal de muchas especies animales (Harper *et al.* 2003) y, bajo condiciones predisponentes, es el agente etiológico de un amplio rango de infecciones (Davies *et al.* 2004).

Varios autores han descrito cambios microscópicos en el tracto respiratorio alto de conejos con la forma natural de la enfermedad encontrando hiperactividad de las células caliciformes, necrosis, vacuolización intracitoplasmática e infiltración de PMN (Botero & Iregui, 1999; Al Haddawi *et al.* 1999; Esquinas *et al.* 2004). Esquinas (2007) y Gallego (2007) han evaluado cualitativa y cuantitativamente las lesiones en experimentos *in vitro* realizados exponiendo, individualmente, septos de feto de conejo a *P. multocida*, *B. bronchiseptica* y sus lipopolisacáridos, confirmado que tanto las bacterias individualmente como sus LPS pueden ocasionar cambios tempranos en este tipo de tejidos.

En trabajos con *P. multocida* y su LPS (Esquinas, 2007), se hicieron evidentes cambios de dos tipos: degenerativos y de hiperactividad. Entre los primeros, se encuentran lesiones, como aumento de los espacios intercelulares, vacuolización citoplasmática, descamación celular y células en necrosis o apoptosis. Estos hallazgos coinciden, con lo encontrado por otros autores, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, Al Haddawi *et al.* (1999) describen en conejos infectados, experimentalmente con *P. multocida*, cambios degenerativos en las células ciliadas, como vacuolización citoplasmática, pérdida de cilios y necrosis tanto en cavidad nasal como en traquea de animales infectados experimentalmente, así como hipertrofia de las células caliciformes. Esquinas *et al.* (2004) encontraron cambios similares en animales con

la forma natural del complejo Pasteurella-Bordetella en conejos, en los cuales se demostró el mismo tipo de cambios celulares degenerativos e hiperactividad de células caliciformes asociadas siempre con infiltración de PMN en el epitelio y en la lámina propia.

Varios autores atribuyen muchos de estos cambios a la acción directa de la bacteria con algunos de sus factores de virulencia, como las porinas. En el caso de la *P. multocida*, se describe la proteína H (OmpH), la cual actúa como formadora de canales transmembranales, los cuales pueden causar un daño homeostático en las células induciendo su hinchamiento, degeneración y muerte (Luo *et al.* 1997, Gorga *et al.* 2001).

Igualmente, se ha demostrado que el LPS es capaz de inducir tanto necrosis como apoptosis en varios tipos de tejidos y células por vías diferentes. El proceso de apoptosis puede ser tanto bioquímico como morfológicamente distinto al de la necrosis y contribuye al daño de los tejidos. Las vías de señalización que promueven la apoptosis, se pueden dividir en dos: la vía intrínseca (mediada por receptores de membrana) y la vía extrínseca (dependiente de la mitocondria). Los receptores de membrana pertenecen a una superfamilia de los del TNF y terminan en la activación de la vía de las caspasas. La vía extrínseca es dependiente de la permeabilidad de la membrana mitocondrial y no requiere de receptores para ser activada (Neff *et al.* 2006). Galdiero *et al.* (2000), demostraron que el LPS y las porinas derivadas de la *P. multocida*, inducían apoptosis en células espermáticas por daño directo sobre su membrana externa. En nuestro caso la apoptosis y la necrosis, se pueden deber tanto a la acción directa de la bacteria como la del LPS y, de acuerdo con algunos autores, este tipo de cambios tempranos ocurren en los epitelios, como mecanismo de defensa para eliminar el agente injurioso (Williams *et al.* 1994, Neff *et al.* 2006), sin embargo, si el agente persiste el daño, se puede extender y hacerse irreversible.

El segundo tipo de cambios es de hiperactividad, los cuales se evidenciaron en las células caliciformes (CC), que respondieron tanto a la *P. multocida* como a su LPS. Se encontró un aumento en la actividad de estas células, la cual se reflejó en un aumento del tamaño, en el contenido intracitoplasmático de moco, presencia de células expulsando su contenido y por un incremento en el acúmulo de moco secretado en la luz del órgano, al cual se asociaban tanto bacterias como células

descamadas y LPS. De la misma manera, trabajos previos en fosa nasal de conejos con la forma natural de la enfermedad respiratoria por *P. multocida* y/o *B. bronchiseptica* documentaron alteraciones similares de las CC (Doncel, 2004). Estos autores propusieron que si bien la participación de las CC en estos procesos infecciosos puede deberse al aumento del número de dichas células, tal vez su mayor significado estaría dado por una mayor actividad sintética y secretora de las mismas. Se sugirió que el aumento tanto en el número como en la función de estas células en la fosa nasal de animales expuestos a las bacterias y/o sus LPS, representaría un reto para la sobrevivencia de los conejos, toda vez que una exagerada producción de moco en este sitio de escaso diámetro, poco expandible y de necesaria rápida circulación del aire, posiblemente llevaría al taponamiento. Se ha demostrado en varios trabajos que la instilación intratraqueal o intranasal de LPS lleva al incremento de la cantidad de moco secretado (Beckmann *et al.* 2002; Wagner *et al.* 2003).

Este cambio ha sido reportado por otros autores en animales expuestos a LPS (Harkema & Hotchkiss, 1991; Shimizu *et al.* 1996). La hipertrofia, hiperplasia y/o metaplasia de las células secretoras en el epitelio y las glándulas submucosas se ha asociado con la hipersecreción de moco y es uno de los principales cambios patológicos encontrados en inflamaciones de las vías aéreas, como rinitis, sinusitis y traqueobronquitis. Harkema & Wagner (2002) demostraron que la instilación intranasal de endotoxina induce una inflamación caracterizada por el incremento en la cantidad de mucosustancias e infiltración de PMN (polimorfos nucleares).

El mecanismo por el cual la endotoxina promueve la producción de moco no es bien entendido. Experimentalmente, se demostró que los cambios en el epitelio disminuyeron al bloquear el ingreso de neutrófilos y que al instilar elastasa de PMN intranasalmente se producían lesiones muy similares, demostrando que células inflamatorias, como los neutrófilos, podrían estar estimulando las modificaciones epiteliales inducidas por la endotoxina (Harkema & Hotchkiss, 1991; Shimizu *et al.* 1996; Shimizu *et al.* 2003). Agusti *et al.* (1998) demostraron un importante papel de los neutrófilos en la degranulación de las células caliciformes, ésta se explica por la presencia de elastasa en las regiones donde se encontraron las células caliciformes degranulándose o

vertiendo su contenido al lumen; la elastasa se encuentra contenida en los gránulos azurófilos de los neutrófilos, y ha demostrado ser un potente secretagogo sobre las glándulas de las vías aéreas y sobre las células caliciformes.

En varios trabajos in vivo se demuestra cómo la endotoxina promueve la producción de mediadores, como TNF- α , IL-1, factor activador plaquetario y elastasa derivada de neutrófilos que inducen de la expresión de genes que codifican para la producción de mucina o inducen la metaplasia celular mucosa. Por el contrario, en otros experimentos con cultivos celulares o explantes nasales, la endotoxina indujo la expresión de genes de mucina sin que fueran necesarios otros mediadores secundarios (Beckmann *et al.* 2002; Wagner *et al.* 2003).

Estos hallazgos pueden en parte, explicarse por la acción del LPS de *P. multocida* A:3, el cual mostró ser tóxico para embriones de ratones y de pollo, causando una mortalidad del 50% con una dosis de 250mg (Ganfield *et al.* 1976). Adicionalmente es reportado por varios autores la respuesta del tracto respiratorio al LPS como una repuesta aumentada de células y de glándulas mucosas y una inflamación aguda compuesta principalmente por PMN (Lefort *et al.* 1998; Harkema & Wagner, 2002; Brass *et al.* 2004). En el caso de *P. multocida* no se han encontrado reportes donde se describan cambios en la mucosa respiratoria inducidos por su LPS, exclusivamente.

En estudios realizados con *P. multocida*, se ha demostrado que la principal causa inflamatoria son los PMN, además que la han relacionado con varias de las lesiones y cambios encontrados en los animales inoculados (Al Haddawi *et al.* 1999; Esquinas *et al.* 2004). Venaille *et al.* (1995) postulan que los PMN serían capaces de inducir descamación de las células epiteliales una vez son estimulados con agentes activadores de PMN como el LPS bacteriano. Tal descamación sería mediada a través de enzimas denaturalizantes e hidrolizantes de los PMN las que ejercerían acción sobre proteínas, como la lámina, la fibronectina y el colágeno tipo IV.

Distintos autores han demostrado que las principales células inflamatorias en ratas expuestas intratraqueal o intranasalmente a distintas dosis de LPS de *Pseudomonas aeruginosa* (20 a 1000mg) son neutrófilos y macrófagos, mientras que los linfocitos y los eosinófilos

no estuvieron presentes (Foster *et al.* 2003; Wagner *et al.* 2003). Según ellos, las dosis entre 20 a 100mg de endotoxina son suficientes para iniciar procesos de inflamación neutrofílica en el pulmón. Reustershan *et al.* (2006) mostraron por técnicas inmunohistoquímicas, como la migración tranendotelial y tranepitelial de PMN en respuesta al LPS, puede ser mediada por la proteína de membrana CXCR2, la cual se expresa principalmente en los capilares, sitio donde residen los PMN.

En conclusión, debido a la amplia distribución de estos agentes infecciosos en varias especies animales, así como la ausencia de modelos de estudio de la fisiopatología de esta clase de enfermedades es muy importante contribuir en el conocimiento de sus comportamientos y su interacción con el hospedero para desarrollar mecanismos de prevención, control y tratamiento, aplicables en varias patologías.

BIBLIOGRAFÍA

- AL-HADDAWI, M.; JASNI, S.; ZAMRI-SAAD, M.; MUTALIB, A.; SHEIKH, O. 1999. Ultrastructural pathology of the upper respiratory tract of rabbits experimentally infected with *Pasteurella multocida* A:3. Res. Vet. Sci. (Inglaterra). 67(2):163-170.
- AL-HADDAWI, M.; JASNI, S.; ZAMRI-SAAD, M.; MUTALIB, A.; ZULKIFLIZ, I.; SON, R. 2000. In vitro study of *Pasteurella multocida* adhesion to trachea, lung and aorta of rabbits. The Vet. J. (Inglaterra). 159(3):274-281.
- AGUSTI, C.; TAKEYAMA, K.; CARDELL, L.; UEKI, I.; LAUSEIER, J.; LOU, Y.; NADEL, J. 1998. Goblet cell degranulation after antigen challenge in sensitized guinea pigs role of neutrophils. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 158 (4):1253-1258.
- ANDREWS, G.; KENNEDY G. 1997. Respiratory diagnostic pathology. Vet. Clin. North America. Food Anim. Pract. 13:515-547.
- BARNUM D. 1990. Socioeconomic significance of the HAP group. Review. Can. J. Vet. Res. 54 Suppl: S1-5.
- BECKMANN, N.; TIGANI, B.; SUGAR, R.; JACKSON, A.; JONES, G.; MAZZONI, L.; FOZARD, R. 2002. Noninvasive detection of endotoxin-induced mucus hypersecretion in rat lung by MRI. Am. J. Physiol. Lung Cell. and Molecular Physiol. 283(1): L22-L30.
- BIENHOFF, S. E.; ALLEN, G.K.; BERG, J.N. 1992. Release of tumor necrosis factor- α from bovine alveolar macrophages stimulated with ovine respiratory viruses and bacterial endotoxins. Vet. Immunol. Immunopathol. (EEUU). 30:341-357.
- BONILLA, F.; GARCÍA-DELGADO, G. 1993. Adherence of *Pasteurella multocida* to rabbit respiratory epithelial cells in vitro. Rev. Latinoam. Microbiol. (México). 35(4):361-369.
- BOTERO, L.; IREGUI, C. 1999. Caracterización de la interrelación entre la *Pasteurella multocida* y la *Bordetella bronchiseptica* con células epiteliales de la cavidad nasal y la nasofaringe durante el curso de la neumonía enzoótica de los conejos. Rev. Med. Vet. Zoot. (Colombia). 46:21-39.
- BORKOWSKA-OPACA, B.; RUTKOWSKA-JURGA, I.; TRUSZYŃSKY, M. 1995. Determination of the serotypes of *Pasteurella multocida* strains isolated from rabbit. Bull. Vet. Ins. Pulawy. (Bulgaria) 39:9-12.
- BOSCH, M.; GARRIDO, E.; LLAGOSTERA, M.; PÉREZ DE ROZAS, A.; BADIOLA, I.; BARBÉ, I. 2002. Characterization of the *Pasteurella multocida* hgbA gene encoding a hemoglobin-binding protein. Infect. Immun. (EEUU). 70(11):5955-5964.
- BOYCE, J.; ADLER, B. 2000. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). Infect. Immun. 68:3463-3468.
- BRASS, D.; SAVOV, J.; WHITEHEAD, G. 2004. LPS binding protein is important in the airway response to inhaled endotoxin. J Allergy Clin Immunol. (EEUU). 114(3):586-92.
- BROGDEN, K.A.; ADLAM C., R.C.; KNIGHTS, J.M.; ENGEN. R.L. 1989. Effect of *P. haemolytica* (A1) capsular polysaccharides on sheep lung in vivo and on pulmonary surfactant in vitro. Am. J. Vet. Res. 50:555-559.

- BROCKMEIER, S.; REGISTER, K. 2000. Effect of temperature modulation and bvg mutation of *Bordetella bronchiseptica* on adhesion, intracellular survival and cytotoxicity for swine alveolar macrophages. *Vet. Microbiol.* (Holanda). 73(1):1-12.
- BUREAU, F.; DETILLEUX, J.; DORTS, T.; UYSTEPRUYST, C.; COGHE, J.; LEROY, P.; LEKEUX, P. 2001. Spirometric performance in belgian blue calves: I. Effects on economic losses due to the bovine respiratory complex. *J. Anim. Sci.* (EEUU). 79(5):1301-1304.
- CARTER, G. 1988. Serological classification of *Pasteurella*. *Vet. Rec.* (Inglaterra). 26;122(13):311.
- CHAMPLIN, F.R.; SHRYOCK T.R.; PATTERSON, C.E.; AUSTIN, F.W.; RYALS, P.E. 2002. Prevalence of a novel capsule-associated lipoprotein among *Pasteurellaceae* pathogenic in animals. *Curr. Microbiol.* (Francia) 44(4):297-301.
- CHENGAPPA, M; CARTER, B; BAILIE W. 1986. Identification of type D *Pasteurella multocida* by counterimmunoelectrophoresis. *J Clin Microbiol.* (EEUU). 24(5):721-723.
- CHEN, L.; PAULSEN, D.; SCRUGGS, D.; BANES, M, REEKS B.; LAWRENCE M. 2003. Alteration of DNA adenine methylase (Dam) activity *Pasteurella multocida* causes increased spontaneous frequency and attenuation in mice. *Microbiol.* (EEUU). 149: 2283-2290.
- CONFER, A. W.; SUCKOW, M. A.; MONTELARGO, M.; DABO, S. M.; MILOCIO, L. J.; GILLESSTIE, A.; MEREDIYH, G. L. 2001. Intranasal vaccination of rabbits with *Pasteurella multocida* outer membranes that express iron-regulated proteins. *Am J. Vet. Res.* 62(5):697-703.
- COY, S.; LEE, M. D.; SANDER, J. 1997. Intrastrain variation of lipopolysaccharide of *Pasteurella multocida* in turkeys. *Am J Vet Res.* 58(7):755-759.
- DAVIES, R.; MACCORQUODALE, R.; REILLY, S. 2004. Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Vet. Microb.* (Holanda). 99:145-158.
- DEBOER, J.; WOLBINK, G.; THUIS, L.; BAARS, J.; WAGSTAFF, J.; HACK, E. 1992. Interplay of complement and cytokines in the pathogenesis of septic shock. *Immunopharmacol.* (EEUU) 24:135-148.
- DEEB, B.; DIGIACOMO, R.; BERNARD, B.L.; SILVERNAGEL, S. 1990. *Pasteurella multocida* and infections in rabbits. *J. Clin. Microbiol* (EEUU). 28:70-75.
- DEEB, B.; DIGIACOMO, R. 2000. Respiratory diseases of rabbits. *The veterinary clinics of North America. Exotic An. Pract.* 3(2):465-480.
- DE-ANGELIS, P.; GUNAY, N.; TOIDA, T.; MAO, W.; LINHARDT, R. 2002. Identification of capsular polysaccharides of type D and F *Pasteurella multocida* as unmodified heparin and chondroitin, respectively. *Carbohydr. Res.* (EEUU). 337(17):1547-1548.
- DIGIACOMO, R.; GARLINGHOUSE, L.; VAN HOOSIER, G. 1983. Natural history of infection with *Pasteurella multocida* in rabbits. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183(11):1172-1175.
- DIGIACOMO, R.; DEEB, B.J.; GIDDENS, W.E.; BERNARD, B.L.; CHENGAPPA, M.M. 1989. Atrophic rhinitis in New Zealand white rabbits infected with *Pasteurella multocida*. *Am. J. Vet. Res.* 50(9):1460-1465.
- DONCEL, B. 2004. Cuantificación y caracterización histoquímica preliminar de las células caliciformes en fosa nasal y nasofaringe de conejos sanos y con el síndrome de neumonía enzoótica. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. U. Nacional de Colombia.
- DOWLING, A.; HODGSON, J.; SCHOCK, A.; ECKERSALL, P.; MCKENDRICK, I. 2002. Experimental induction of pneumonic pasteurellosis in calves by intratracheal infection with *Pasteurella multocida* biotype A:3. *Res. Vet. Sci.* (Inglaterra). 73(1):37-44.
- ESQUINAS, P.; IREGUI, C.; BOTERO, L. 2004. Comparación ultraestructural e inmunohistoquímica del

- epitelio nasal de conejos sanos y con el complejo respiratorio *Pasteurella-Bordetella*. Memorias IV Reunión Anual de Patología Veterinaria. La Plata. Argentina. IV RAPAVE: p.56.
- ESQUINAS, P. 2007. Interacción in vitro entre la *Pasteurella multocida* y/o su lipopolisacárido con epitelio de septo nasal de conejo. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. U. Nacional de Colombia.
- ESSLINGER, J., SELEIM, R.S.; HERRMANN, G.; BLOBEL, J. 1994. Adhesin of *Pasteurella multocida* to Hela cells and to macrophages of different animal species. Rev. Med. Vet. (Inglaterra) 145(1): 49 :53.
- FLATT R. ; DUNGWORTH D. 1971a. Enzootic pneumonia in rabbits: naturally occurring lesions in lungs of apparently healthy young rabbits. Am J Vet Res, 32(4): 621-626.
- FLATT R. ; DUNGWORTH D. 1971b. Enzootic pneumonia in rabbits: microbiology and comparison with lesions experimentally produced by *Pasteurella multocida* and a chlamydial organism. Am J Vet Res. 32(4):627-637.
- FOSTER, J.E., GOTT, K.; SCHUYLER, M.R.; KOZAK, W.; TESFAIGZI, Y. 2003. LPS-induced neutrophilic inflammation and Bcl-2 expression in metaplastic mucous cells. Am. J. Physiol. Lung Cell. Molecular Physiol. 285(2):L405-L414.
- FROST, A.; ADLER, B. 2000. *Pasteurella multocida*: the elusive determinants of virulence and immunity. Vet. Microb. 72:1-2.
- GALDIERO, M.; FOLGORE, A.; UNZZO, I.; GALDIERO, E. 2000. Neutrophil adhesion and transmigration through bovine endothelial cells in vitro by protein H and LPS of *Pasteurella multocida*. Immunobiology (Alemania). 226:57.
- GALLEGO, C. 2007. Interacción in vitro entre la *Bordetella bronchiseptica* y/o su lipopolisacárido con epitelio de septo nasal de conejo. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. U. Nacional de Colombia.
- GANFIELD, D.; REBERS, P.; HEDDLESTON, K. 1976. Immunogenic and toxic properties of a purified lipopolysaccharide-protein complex from *Pasteurella multocida*. Infect. Immun. 14(4):990-999
- GLASS, L.; BEASLEY, J. 1989. Infection with and antibody response to *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in immature rabbits. Lab. Anim. Sci. (EEUU). 39(5):406-410.
- GLAVITS, R.; MAGYAR, T. 1990. The pathology of experimental respiratory infection with *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in rabbits. Acta. Vet. Hungarica. 38(3):211-215.
- GLORIOSO, J.; JONES, G.; RUSH, H.; PENTLER, L.; DARIF, C.; COWARD J. 1982. Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. Infec. Immun. 35:1103-1109.
- GRIFFIN, D. 1997. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Practice. 13(3):367-377.
- GORGA, F.; GALDIERO, M.; BUOMMINO, E.; GALDIERO, E. 2001. Porins and lipopolysaccharide induce apoptosis in human spermatozoa. Clin. Diagn. Lab. Immun. (EEUU). 8(1):206-208.
- HARKEMA, J.; HOTCHKISS, J. 1991. In vivo effects of endotoxin on nasal epithelial mucosubstances: quantitative histochemistry. Exp Lung Res. (EEUU). 17(4):743-61.
- HARKEMA, J.; WAGNER, J. 2002. Non-allergic models of mucous cell metaplasia and mucus hypersecretion in rat nasal and pulmonary airways. Novartis Found Symp. (Inglaterra). 248:181-97; Discussion 197-200, 277-82.
- HARPER, M.; BOYCE, J.; WILKIE, W.; ADLER, B. 2003. Signature-tagged mutagenesis of *Pasteurella multocida* identifies mutants displaying differential virulence characteristics in mice and chickens. Infect. Immun. 71(9):5440-5446.
- HARVILL, E.; PRESTON, A.; COTTER, P.; ALLEN, A.; MASKELL, D.; MILLER, J. 2000. Multiple roles

- for *Bordetella* lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. *Infect. Immun.* 68(12):6720-6728.
- HORADAGODA, N.U.; HODGSON, J.C.; MOON, G.M.; WIJEGARDANA, T.; ECKERSALL, P. 2001. Role of endotoxins in the pathogenesis of haemorrhagic septicaemia in buffalo. *Microb. Pathol. (Inglaterra)*. 30(3):171-178.
- HUERTAS, C.; IREGUI, C. 1996. Estudio prospectivo de la neumonía enzoótica por *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* en dos granjas cunícolas de la altillanura de Bogotá. Abstracts XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Campo Grande, Brasil.
- HUNT, M.L.; BOUCHER, D.J.; BOYCE, J.D.; ADLER, B. 2001. In vivo-expressed genes of *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* 69:3004-3012.
- KPODEKON, M.; RIDEAUD, P.; COUDERT P. 1999. Pasteurellosis du lapin: revue. *Rev. Méd. Vét. (Francia)*. 150:221-232.
- LAX, A.J.; THOMAS, W. 2002. How bacteria could cause cancer: one step at a time. *Trends Microbiol. (EEUU)*. 10(6):293-299.
- LEFORT, J.; SINGER, M.; LEDUC, D.; RENESTO, P.; NAHORI, M.; HUERRE, M.; CREMINON, C.; CHIGNARD, M.; VARGAFTIG, B. 1998. Systemic administration of endotoxin induces bronchopulmonary hyperreactivity dissociated from TNF-alpha formation and neutrophil sequestration into the murine lungs. *J Immunol. (EEUU)*. 1;161(1):474-80.
- LUO, Y., GLISSON, J.R.; JACKWOOD, M.W.; HANCOCK, R.E.; BAINS, M.; CHENG, I.H.; WANG, C. 1997. Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene (ompH) of *Pasteurella multocida* X-73. *J. Bacteriol. (EEUU)*. 179:7856-7864.
- MANNING, P. 1982. Serology of *Pasteurella multocida* in laboratory rabbits: a review. *Lab. Anim. Sci.* 32:666-671.
- MEYER, F.P. 1991. Aquaculture disease and health management. *J. Anim. Sci.* 69:4201-4208.
- MICHAEL, F.; VINOGRADOV, E.; LI, J.; COX, A. 2005. Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Pasteurella multocida* genome strain Pm70 and identification of the putative lipopolysaccharide glycosyltransferases. *Glycobiology. (Inglaterra)*. 15(4):323-33.
- MORENO, A. 1995. Aislamiento y tipificación de *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* involucradas en el complejo neumónico de conejos en una granja de la Sabana de Bogotá. Tesis de Pregrado. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. U. N. de Colombia.
- MURTAUGH, M.P.; BAARSCH, M.J.; ZHOV, Y.; SCAMURRA, R.W.; LIN, G. 1996. Inflammatory cytokines in animal health and disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54:45-55.
- NEFF, S.; ZAGRAGGEN, B.; NEFF, T.; JAMNICKI-ABEGG, M.; SUTER, D.; SCHIMMER, R.; BOOY, C.; JOCH, H.; PASCH, T.; WARD, P.; BECK-SCHIMMER, B. 2006. Inflammatory response of tracheobronchial epithelial cells endotoxin. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Molecular Physiol.* 290:L86-L96.
- RAETZ, C.; WHITFIELD, C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Ann. Rev. Biochem. (EEUU)*. 71:635-700.
- RAMDANI, B.; ADLER, B. 1991. Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide (LPS) antigens of *Pasteurella multocida* and the role of LPS in immunity. *Vet. Microbiol. (Holanda)*. 15;26(4):335-47.
- REUTERSHAN, J.; MORRIS, M.; BURCIN, T.; SMITH, D.; CHANG, D.; SAPRITO, M.; LEY, K. 2006. Critical role of endothelial CXCR2 in LPS induced neutrophil migration into the lung. *J. Clin. Invest. (EEUU)* 116:695-702.
- RIDEAUD, P.; COUDERT, P.; MERCIER, P.; HERVOUET, P. 1992. A comparative study of the virulence of *Pasteurella multocida* from rabbits (*O. cuniculus*).

- Memorias. Fifth World Rabbit Congress (Francia). C: 1389-1400.
- SÁNCHEZ, S.; RITCHIE, B.; MIZAN, S.; LEE, M. 2000. Pasteurellosis in rabbits. Compendium On Continuing Education For The Practising - Veterinary Learning Systems Co., INC. (EEUU). 22:344-351.
- SÁNCHEZ, S.; MIZAN, S.; QUIST, C.; SCHRODER, P.; JUNEAU, M.; DAWE, D.; RITCHIE, B.; LEE, M. 2004. Serological response to *Pasteurella multocida* NanH sialidase in persistently colonized rabbits. Clin. Diagn. Lab. Immunol. (EEUU). 11(5):825-834.
- SHIMIZU, T.; TAKAHASHI, Y.; KAWAGUCHI, S.; SAKAKURA, Y. 1996. Hypertrophic and metaplastic changes of goblet cells in rat nasal epithelium induced by endotoxin. Am. J. Resp. Crit Care Med. 153:1412-1418.
- SHIMIZU, T.; SHIMIZU, S.; HATTORI, R.; GABAZZA, R.; MAJIMA, R. 2003. A mechanism of antigen-induced goblet cell degranulation in the nasal epithelium of sensitized rats. J Allergy Clin Immunol. (EEUU). 112(1):119-25
- SELEIM, R. 1996. Study mayor virulence factors of *P. multocida* isolated from different sources. New Egypt J. Med. 14(6):60-64.
- SUCKOW, M.; MARTIN, B.; BOWERSOCK, T.; DOUGLAS, F. 1996. Derivation of *Pasteurella multocida*-free rabbit litters by enrofloxacin treatment. Vet. Microbiol. 51(1-2):161-168.
- TAKASHIMA, H.; SAKAI, H.; MASEGI, T. 2001. Detection of antibodies against *Pasteurella multocida* using immunohistochemical staining in an outbreak of rabbit pasteurellosis. J Vet Med Sci. (Japón). 63(2):171-4.
- VENAILLE, T.; MENDI, A.; PHILLIPS, M.; THOMSON, P.; ROBINSON, B. 1995. Role of neutrophils in mediating human apithelial cell detachment from native basement membrane. J. Allergy Clin. Immunol. (EEUU). 95: 597-606.
- WAGNER, J.G.; VAN DYKEN, S.J.; WIERENGA, J.R.; HOTCHKISS, J.A.; HARKEMA, J.R. 2003. Ozone exposure enhances endotoxin-induced mucous cell metaplasia in rat pulmonary airways. Toxicol. Sci. (USA). 74(2):437-446.
- WATT J.; SWIATLO, E.; WADE, M.; CHAMPLIN, M. 2003. Regulation of capsule biosynthesis in serotype A strains of *Pasteurella multocida*. FEMS Microbiol. Letters (Inglaterra). 225(1):9-14.
- WILLIAMS, A.; TOPLEY, M.; WILLIAMS, B. 1994. Effect of liposomally encapsulated MTX-DMPE conjugates upon TNF alpha and PGE2 release by lipopolysaccharide stimulated rat peritoneal macrophages. Biochim Biophys Acta. (Holanda). 11;1225(2):217-222.

Recibido: Febrero 8 de 2007

Aceptado: Abril 17 de 2007

NUTRICIÓN HUMANA, MEJORAMIENTO VEGETAL Y METABOLISMO SECUNDARIO: UNA REVISIÓN

HUMAN NUTRITION, PLANT BREEDING AND SECONDARY METABOLISM: A REVIEW

Marco Cabezas Gutiérrez ¹

RESUMEN

Los alimentos de origen vegetal contienen una amplia variedad de vitaminas, minerales y metabolitos únicos, que pueden tener efectos beneficiosos o detrimentales en la salud y el bienestar de los humanos. Una mezcla de carbohidratos, lípidos, aminoácidos, proteínas, 17 elementos minerales y 13 vitaminas son componentes esenciales de la dieta. En países en desarrollo, el problema de hambre y de desnutrición es cada día más preocupante; aspecto distinto es el encontrado en los países avanzados donde la problemática de salud se debe principalmente a enfermedades coronarias y afecciones debidas al sobrepeso. La ingeniería genética, la proteómica, la ingeniería metabólica y otras herramientas del fitomejoramiento, han sido enfocadas para aumentar la calidad y la inocuidad de los alimentos de origen vegetal. En el presente artículo, se hace una revisión de los principales grupos de compuestos considerados esenciales en la salud y en la alimentación humana, la forma en que pueden ser mejorados y las perspectivas de su utilización hacia un futuro mediano.

Palabras clave: Vitaminas, folatos, pantotenato, fitomejoramiento, resveratrol.

SUMMARY

Plant-derived foods contain a wide variety of vitamins, minerals and unique metabolites, which may have beneficial or detrimental effects on human health and well-being. A mixture of carbohydrates, lipids, amino acids, proteins, 17 mineral elements and 13 vitamins are the essential components of the diet. In developing countries the problem of hunger and malnutrition is of major concern every day, being a different aspect the one found in developed countries where the health problem is due mainly to coronary diseases and affections due to overweight. Genetic engineering, the proteomic, the metabolic engineering and other tools of plant breeding, have been focused to increase the quality and the innocuity of food of plant origin. In this article the main groups considered essential compounds for the health and the human feeding, the form in which they can be improved and perspectives of their use within a mediate future is revised.

Key words: Vitamins, folates, pantothenate, plant breeding, resveratrol.

INTRODUCCIÓN

Las primeras tres décadas del siglo XX fueron llamadas la edad de oro de las ciencias nutricionales, debido a que la gran mayoría de los requerimientos en la dieta humana, para mantener buena salud y óptimo estado nutricional, fueron descubiertos. Las vitaminas, los minerales, los aminoácidos y los ácidos grasos necesarios para aplacar los síntomas de hambre y de desnutrición fueron identificados y caracterizados y se estimaron las

¹ Ingeniero Agrónomo. M.Sc. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A. Dirección para correspondencia: mcabezas@udca.edu.co

cantidades de nutrimentos requeridas para satisfacer dichas necesidades. Sin embargo, en la actualidad, la deficiencia de micronutrientes y de vitaminas continúa limitando la adecuada nutrición de la población, especialmente en los países pobres. Caso contrario, se nota en los países avanzados, allí los esfuerzos gubernamentales, las condiciones sociopolíticas y las culturales han erradicado el hambre en alta proporción y se ha conseguido disminuir la mortalidad, por efectos nutricionales. El problema en el mundo desarrollado parece ser la alta incidencia de enfermedades coronarias, el cáncer en sus distintas manifestaciones, la diabetes y la obesidad (Oltmans *et al.* 2005; Xiao *et al.* 2006).

Los estudios demostraron cómo el consumo de frutas y de verduras ha disminuido los riesgos y las enfermedades en el mundo occidental y se correlacionan negativamente con los niveles de cáncer y enfermedades cardiovasculares. No obstante, muy pocos son los lugares en el planeta donde el consumo de estos alimentos es el adecuado. Estas causas hacen pensar que, ya despejado el camino para encontrar la cura a los problemas nutricionales del mundo, se deba entonces utilizar las herramientas aportadas por los avances de la ciencia y la tecnología, en términos de producción de alimentos suficientes y de alta calidad. La agricultura y más aún una de sus disciplinas, el mejoramiento genético de plantas cultivadas es una de esas herramientas. Se conocen varios esfuerzos por obtener alimentos enriquecidos y fortificados, producto de la manipulación genética de las plantas, más que por el uso de tecnologías agroindustriales. El arroz conocido como "Golden Rice", los maíces modificados genéticamente para incrementar los niveles de proteína, las nuevas variedades de canola, papa y tomate, con mayores contenidos de carotenoides, son algunos de los ejemplos (Ghandilyan *et al.* 2006; Schaub *et al.* 2005).

En el presente documento, se presentan algunos de los principales aspectos que, en la actualidad, se manejan para mejorar la calidad alimenticia de las especies agrícolas, la relación de estos procesos con el metabolismo vegetal y las tendencias actuales de aspectos, como la biofortificación, el enriquecimiento con micronutrientes, el incremento de antioxidantes y la actividad de las vitaminas y cofactores bioquímicos.

Especial atención, se presta a algunos alimentos y bebidas de origen tropical, como el café y el chocolate, así como también a los efectos benéficos de los vinos y las

hortalizas crucíferas buscando así contextualizar al lector en la relación metabolismo secundario, calidad nutricional y mejoramiento genético de plantas cultivadas.

Fortificación de alimentos

Ha sido considerada como la mejor estrategia a largo plazo para prevenir las deficiencias nutricionales, especialmente en áreas desarrolladas (Johns & Eyzaguirre, 2007). Consiste en adicionar en el proceso postcosecha y/o agroindustrial, los elementos nutricionales requeridos para balancear las dietas de la población (White & Broadley, 2005). En los países en desarrollo puede presentar algunas dificultades, especialmente debido a la falta de infraestructura, como laboratorios especializados en biofortificación y a la discontinuidad de los programas, tal y como sucedió con el mejoramiento del maíz en Colombia (Datta *et al.* 2003; Lucca *et al.* 2006).

El hierro es el mineral de más difícil suplementación, debido a algunos problemas técnicos derivados de la solubilidad de compuestos ferrosos. En ocasiones, la reacción del hierro ferroso produce colores indeseables en los productos, afectando la presentación de los mismos (López & Martos, 2004).

Biofortificación

Comparado con los alimentos fortificados, las plantas biofortificadas tienen grandes ventajas, debido a que no necesitan procesamientos específicos una vez almacenados y no requieren infraestructura especial (Welch & Graham, 2004; White & Broadley, 2005). Sin embargo, las variedades de cereales con altos micronutrientes no son valoradas como debiera ser en la alimentación humana. Al incrementar la eficiencia en la toma de nutrientes del suelo, se puede también alcanzar una mayor resistencia a enfermedades (Bouis, 2003). La biofortificación, se puede desarrollar a partir de las siguientes estrategias (King, 2002):

Mejoramiento tradicional. Según Lucca *et al.* (2006), el IRRRI en poblaciones segregantes de arroz, encontró variaciones en la concentración de Fe entre 7,5 y 24,4mg.kg⁻¹. Esto refleja, la importancia de identificar genotipos de buena concentración del mineral y buena disposición del material genético para incrementar los niveles del nutrimento. Las reducciones de ácido fítico, uno de los principales antinutrientes, fueron parte de la causa de los aumentos de hierro, pero se debe tener

en cuenta que el ácido fítico es fundamental como despensa de fósforo en la germinación de las semillas, hecho contraproducente desde el punto de vista agrícola (Duhan *et al.* 2002).

Modificaciones genéticas. La concentración de micronutrientes en los tejidos de plantas agrícolamente aprovechables están altamente controlados por mecanismos homeostáticos, los cuales son responsables de la absorción, la traslocación y la redistribución de minerales en los diferentes tejidos (Welch & Gram, 2004). La primera barrera, se encuentra en la interfase suelo-raíz. Con base en este aspecto, las plantas han desarrollado dos tipos de estrategias: las dicotiledóneas y las monocotiledóneas no gramíneas, sobrerregulan la reducción del hierro, el hierro ferroso transportado y las ATPasas dependientes de protones (Johns & Eyzaguirre, 2007). Las plantas gramíneas segregan unos compuestos de bajo peso molecular llamados fitosideróforos y una vez tomado el hierro por estos accesorios es llevado vía xilema, transportado al floema y de allí a los órganos de almacenamiento para ser aprovechado en la alimentación humana (Meng & Yang, 2005).

Biofortificación del arroz como comida básica

El arroz es el alimento básico para los habitantes en más de 33 países, cuyos pobladores son dependientes directos de este grano. Se considera el cereal más importante del mundo, pues provee el 80% de las calorías para unos 3.000 mil millones de personas, la mitad de la población mundial. En arroz, como en todos los cereales, la gran mayoría de micronutrientes se encuentran almacenados en la cubierta, la aleurona y el embrión. El gran inconveniente radica en que en los procesos de molinería estas partes del grano son eliminadas por tener altos componentes lipídicos que, una vez descompuestos, producen ranceamiento y, por tanto, daños en la calidad del producto almacenado. Con el trillado, se pierde gran proporción de nutrimentos. El endospermo tiene bajas cantidades de vitamina A y muy limitados contenidos de hierro y otros nutrimentos (Schaub *et al.* 2005; Lucca *et al.* 2006).

Los avances en la ingeniería genética, se han concentrado en darle calidad al grano mediante la introducción de hierro y de enzimas capaces de sintetizar β -caroteno en el endospermo. Producto de ello es el grano denominado "Golden Rice" (GR), el cual fue obtenido mediante

transformación genética de una variedad de *Oriza sativa* L. tipo japónica. El grano de GR es de color amarillo, gracias a que en el endospermo se pudo introducir un gen capaz de sintetizar la provitamina A, haciendo del grano un producto prometedor para disminuir las deficiencias de la vitamina A, especialmente, en países en desarrollo (Meng & Yang, 2005).

La introducción de la vía del β -caroteno en el endospermo de los granos de arroz, se logró a través de la activación de la fitoenosintasa, para producir el producto intermedio fitoeno proveniente de geranil-geranil-difosfato (GGDP). La síntesis de β -caroteno requiere de otros tres pasos a saber: acción de la fitoeno desaturasa, acción de la ζ -saturasa y acción del licopeno- β ciclasa. Las saturasas son activadas por una enzima presente en la bacteria *Erwinia carotovora*, la cual fue usada mediante técnicas de ingeniería genética para proveer las enzimas en el endospermo del arroz y así darle la coloración amarilla, producto de la presencia del pigmento antes referenciado (Al Babili & Beyer, 2005).

Biosíntesis de la vitamina B₂

Con base en lo expuesto por Fischer & Bacher (2006) y Schramek *et al.* (2001), la riboflavina, Vitamina B₂ es el precursor universal de la flavocoenzima rivo flavin monofosfato (FMN) y de flavin-adenin dinucleótido (FAD), importantes cofactores en la cadena de transferencia de electrones, en la actividad membrana y en la producción de energía en varios organelos. Los microorganismos y los vegetales las sintetiza, pero los animales y el hombre deben tomarla de la dieta.

La biosíntesis de la riboflavina requiere una molécula de guanocin tri fosfato (GTP) y dos moléculas de ribulosa 5-fosfato (Bacher *et al.* 2000). El anillo imidazol del GTP es abierto de forma hidrolítica, produciendo 2,5-diaminopirimidina, la cual es convertida a 5-amino-6-ribitilamino-3,4(1H,3H)-pirimidinediona. La condensación de 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato, obtenida de la ribulosa 5-fosfato, produce 6,7-dimeti-8-ribitidillumacina. La desmutación de de este compuesto da como resultado 5-amino-6-ribitidil amino (1H,3H)-pirimidiona, la cual se recicla para recuperar la vía. La vía biosintética en plantas y en eubacterias es muy similar, no sucede lo mismo con lo reportado para hongos y arquea (Fischer & Bacher, 2005).

Se han encontrado once enzimas comprometidas con la síntesis de vitamina B₂ en plantas: GTP ciclohidrolasa, 5-fosfato de aminosasa, 5-fosfatoreductasa en dos pasos distintos, pirimidin dienona-5-fosfatodeaminasa, una fosfatasa, 2-butanona-4 fosfato sintasa, dietil 8-ribitol lumazinasintasa, rivo flavinsintasa, rivo flavinkinasa y FAD sintasa (Fischer & Bacher, 2006).

Biosíntesis del pantotenato en plantas superiores

El pantotenato, vitamina B₅ es un compuesto soluble en agua, el cual es precursor de 4'-fosfopantoteteina, coenzima A, proteínas tipo transportador, todos cofactores esenciales en muchos procesos metabólicos, claves en el organismo humano. Ejemplo de ello es el papel de la coenzima A en el ciclo de Krebs, la oxidación, la producción de lípidos y de ácidos grasos y, en el caso de plantas, la base para el metabolismo secundario, incluyendo lignina (Chakauya *et al.* 2006).

Se estima que alrededor de 100 enzimas requieren de pantotenato como cofactor. Los animales deben obtener esta vitamina a partir de su dieta, mientras que plantas y microorganismos la sintetizan permanentemente. Pantotenato, se deriva del griego pantos, el cual significa universal, entendiéndose así su localización en todos los tejidos de los organismos vivos. La ausencia de este metabolito en animales hace que las enzimas estén sujetas al ataque de organismos productores de tóxicos, antibióticos e incluso al ataque de moléculas de plaguicidas (Webb *et al.* 2004). En la industria, al año se producen alrededor de 4000t de pantotenato, el cual es utilizado en la producción de complementos alimenticios, productos de belleza y protectores de piel, principalmente (Chakauya *et al.* 2006).

Los acercamientos para entender la síntesis del pantotenato en plantas son de reciente producción, de hecho, inicialmente se trabajó con base en lo encontrado para *Escherichia coli*. Muy posiblemente, se debió a que en vegetales existía la dificultad para identificar mutantes con bloqueo de los diferentes pasos. Las vías tanto en bacterias como en plantas tienen algo de similitud, pero varían en los tipos de enzimas involucrados y en organización de la vía (Webb *et al.* 2004).

La biosíntesis del pantotenato tiene dos ramas: en la primera, el α -cetoisovalerato, se convierte en cetopan-

toato por acción de la enzima cetopantoato hidroximetil-transferasa (KPHMT) y con 5,10-metilen tetrahidrofolato, como cofactor. Posteriormente, el cetopantoteato es reducido a pantoato mediante la enzima cetopantotea-toreductasa y NADPH, como cofactor. De la otra rama, una molécula de L-aspartato es transformada a β -alanina gracias a la L-aspartato- α -decarboxilasa. β -alanina y pantoato se unen para formar pantotenato, acción catalizada por la pantotenatosintetasa, dependiente de ATP (Chakauya *et al.* 2006).

Manipulación de los niveles de pantotenato en plantas

La producción actual de pantotenato es principalmente de origen químico, pero recientes progresos en las técnicas de ingeniería metabólica han propuesto posibilidades de enriquecimiento de alimentos mediante la biofortificación. Existen algunos avances en este sentido, con el uso de cepas recombinantes de bacterias con el incremento en la expresión de las enzimas 3 y 4 de la ruta (ascorbato decarboxilasa y pantoteato sintetasa) (Kupke *et al.* 2003; Rathinasabapathi & Raman, 2005). Sin embargo, se requiere de mayor investigación en el tema, ya que esto puede llevar a la obtención de alimentos con amplias ventajas comparativas para la nutrición humana.

Folatos en plantas: biosíntesis, distribución y enriquecimiento

Los folatos son vitaminas que intervienen en la transferencia del carbono 1 (C1), en un juego de reacciones normalmente denominadas metabolismo C1. Químicamente, las moléculas de los folatos están compuestas por un grupo Pterin, ácido p-aminobenzoico (pABA) y una cadena de glutamato, con una variación entre 1 y 14 unidades (Rébeillé *et al.* 2006; Basset *et al.* 2005). Estos autores indican que el pool celular de folato está representado por una mezcla compleja de moléculas integradas, las cuales difieren en el estado de oxidación del anillo pterin (di o tetra hidroxifolato; H₂F-Glun, H₄F-Glun), en el estado de oxidación carbono 1 y en el número de moléculas de glutamato. Las unidades C1 son transportadas solamente por el H₄F-Glun y pueden ser ligadas al nitrógeno 5 o al nitrógeno 10, en forma de puente.

Estas especies de folatos ofrecen unidades de carbono 1 para vías metabólicas que tienen una destacada impor-

tancia para la viabilidad celular. Entre otros aspectos se resaltan: el 10 formil tetrahidrofolato es necesario para la síntesis de purinas y formal methionina tRNA; 5, 10 metilen dihidrofolato es necesario para la síntesis de thimidilato y pantotenato; 5-metiltetrahidrofolato, provee el grupo metil requerido para transformar homocysteina en methionina. El 80% de la methionina proviene de dicha vía. En plantas los folatos están involucrados en vías específicas, como la biosíntesis de clorofila y lignina (Cossins, 2000; Mouillon *et al.* 2002).

Para la salud humana, la deficiencia de folatos conduce a un sin número de enfermedades, como deficiencias en el sistema nervioso, central, enfermedades cardiovasculares, incrementos de homocisteina en el plasma, lo cual induce a riesgos por demencia, enfermedad de Alzheimer y esquizofrenia (Ravel *et al.* 2001). La deficiente síntesis de methionina también da como resultado una deficiente cantidad de Adonet (S-adenosil-L-methionina), trascendental para la metilación del DNA. La hipometilación de las regiones promotoras de genes puede llegar a modificar la expresión genética, en especial para alterar la expresión de oncogénesis (Quinlivan *et al.* 2002). Entre otras consecuencias de la baja cantidad de folatos a nivel celular está la alta concentración de UMP respecto a TMP, debido a la limitación de la oferta de 5,10 metilen H_4F -Glu_n. Esto da como resultado una alta incorporación de UTP dentro del DNA y la consecuente conformación de puntos mutantes, rompimiento sencillo o doble en las cadenas y, finalmente, rompimiento cromosómico. Este fenómeno está relacionado íntimamente con la aparición de cáncer colon-rectal, de hígado, pancreático, bronquial y cervical, así como leucemia (Rèbeillé *et al.* 2006).

Biosíntesis de tetrafolatos en plantas

La síntesis de folatos requiere de la participación de tres compartimentos celulares a saber: mitocondria, citosol y cloroplasto. Posiblemente, la vacuola sirva como órgano de almacenamiento de los productos (Mouillon *et al.* 2002). En el citosol, se requiere de una molécula de GTP para producir hidroximetildihidropterin, en tres pasos. La primera reacción es catalizada por GTP ciclohidrolasa I para formar dihidroneopterin trifosfato. Este producto es la base no solo para la producción de H_4F -Glu_n sino para otros ptereines, una familia de coenzimas involucradas en una amplia variedad de reacciones que actúan como cromóforos. En el siguiente paso, la enzima nudix

hidrolasa remueve el grupo pirofosfato y la dihidroneopterinaldolasa forma el hidrometildihidropterin (Hanson & Roje, 2001; Hanson & Gregory, 2002). Este compuesto entra a la mitocondria donde una pirofosfoquinasa une un grupo pirofosfato para producir H_2 Pterin PPI. De otra parte, con base en una molécula de corismato en el cloroplasto, las enzimas aminodeoxicorismatosintasa y dihidroxicorismatoliasa forman ácido *p*-aminobenzoico, el cual sale del cloroplasto al citoplasma, luego entra a la mitocondria y allí se une con H_2 Pterin, para formar H_2 Pteroato, reacción catalizada por dihidropteroatosintasa. Posteriormente reincorporan, de forma sucesiva, los glutamatos para formar H_4F -Glu_n, mediante la dihidrofolatosintetasa. Este es el producto base de todos los folatos en plantas (Ravel *et al.* 2001; Basset *et al.* 2005; Rèbeillé *et al.* 2006).

Los humanos necesitan consumir cuando menos 400µg de folatos en la dieta, pero en muy pocas ocasiones se logra alcanzar este valor (Hanson & Roje, 2001). En la tabla 1, se muestra el contenido de folatos en algunas especies agrícolas, con el fin de reflexionar sobre lo expuesto anteriormente. Es de anotar que las plantas dicotiledóneas y especialmente las leguminosas tienen altos contenidos de ácido fólico en sus semillas, hecho fundamental para seleccionar dietas apropiadas en humanos.

Ácido ascórbico, biosíntesis y acumulación en plantas

El l-ácido ascórbico (vitamina C) tiene el estatus de vitamina, debido a que algunos animales como primates, tienen poca habilidad para sintetizar este multifuncional cofactor enzimático. La mayor parte de la vitamina C es aportada por la dieta, siendo más alta la concentración en frutas y verduras. Se considera que en raras ocasiones la población humana sufre de deficiencia en vitamina C, a tal punto que no existen esfuerzos para enriquecer los alimentos con este compuesto, tal y como si ocurre con otros metabolitos de su misma naturaleza (Conklin, 2001)

Las plantas contienen una cantidad relativamente alta de ascorbato, donde tiene papel como regulador de diversas reacciones de oxidoreducción y cofactor enzimático. También tiene un papel interesante como fotoprotector, en respuestas hormonales, muerte celular programada, senescencia y ataque de patógenos (Jain

Tabla 1. Contenido de folatos en algunas especies agrícolas. Valores expresados en nmol de ácido fólico por gramo de peso fresco (USDA, 2004).

Producto	Contenido de folato (nmol g ⁻¹)
Arroz blanco	0,13-0,18
Trigo duro	0,84-0,95
Maíz amarillo	0,42
Tomate	0,20-0,64
Alverjas verdes	1,45
Hojas de espinaca	4,31
Frijoles rosados	10,28
Lentejas	962

& Nessler, 2000; Pallanca & Smirnoff, 2000). Por consiguiente su biosíntesis está relacionada con fotosíntesis y respiración. En segundo lugar tiene importancia en la elaboración de alimentos, pues es un comodite de alto volumen y bajos costos utilizado como aditivo vitamínico en diferentes procesos.

Biosíntesis

En mamíferos, la biosíntesis se conoce desde los años 50. La UDP-glucosa derivada del glucógeno, se considera como la materia prima de la síntesis de novo del ácido ascórbico. En plantas, la biosíntesis es diferente, pues se supone que la base de la vía es la oxidación de L-Galactosa, la cual proviene de GDP-L manosa. La fosfomanosaisomerasa cataliza el primer paso de la reacción para formar D-manosa 1- fosfato, la cual con GDP forma GDP- d-manosa, con la consecuente liberación de pirofosfato. GDP-d-manosa forma GDP-l-galactosa mediante una epimerasa, luego se forma L-galactosa 1 -fosfato, mediante una fosforilasa. El producto de esta reacción, la l galactosa, se une con una molécula de L-galactonato para producir L-galactolactona, gracias a un producto proveniente de la pectina, denominado D-galacturonato. Proveniente del *myo*-inositol llega una molécula de gulonato, la cual se une con L-GalL y forma el L-ascorbato, mediante la acción de una deshidrogenada y una citocromooxidasa (Ishikawa *et al.* 2006; Loewus, 1999).

Se conoce que el contenido de ácido ascórbico en plantas está influenciado por la luz y varía durante las

etapas de desarrollo. Se ha encontrado altos contenidos en hojas, en tallos, en frutos y, menores contenidos en semillas y en raíces. La falta de ácido ascórbico, en general, va a producir: disminución en la síntesis de ácido absícico, se afecta el crecimiento y la división celular, concentraciones altas de H₂O₂. Los altos contenidos de ascorbato, se relacionan con el incremento de resistencia al ataque de patógenos, especialmente virus (Smirnoff, 2000).

La vitamina E: papel, biosíntesis y manipulación

Los tococromanoles son moléculas amfifáticas, asociadas con lípidos de membrana, tienen una cabeza que mantiene la superficie de la membrana y un cuerpo completamente saturado, compuesto por 20 carbonos (Schneider, 2005). Tocopheroles y tocotrienoles hacen parte de este grupo de sustancias y difieren por el grado de saturación de los cuerpos hidrofóbicos. Los tocopheroles tienen un cuerpo carbonado completamente saturado proveniente del fitidilfosfato, mientras los tocotrienoles contienen un cuerpo derivado del GGDP y, por tanto, contienen tres enlaces dobles en los carbonos 3, 7 y 11 (Della Penna & Last, 2006). De acuerdo a lo expresado por Traber (2005), la vitamina E de forma activa, está compuesta por una mezcla de tococromanoles, donde la actividad principal se debe a los α -tocopheroles. Todos los tocopheroles sintetizados naturalmente son esteroisómeros, mientras que los sintetizados, de forma química, son mezclas racémicas, de ocho esteroisómeros, los cuales tienen un impacto negativo en la actividad de la vitamina E.

Los tejidos vegetales varían enormemente en el contenido de vitamina E. En general, en plantas fotosintéticamente activas y no estresadas, el contenido de tococromanos está entre 10 y 50 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso fresco, siendo predominantemente α -tocoferol. Las semillas tienen una

mayor cantidad de tococromanos, en rangos de 300 a 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de aceite (Della Pena & Last, 2006). En la tabla 2, se presentan los contenidos de tocoferol en algunos productos agrícolamente aprovechables.

Tabla 2. Niveles de tocoferol y composición de algunos tejidos de plantas. Datos expresados en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso fresco o gramo de aceite (Hess, 1993).

Planta y órgano	Total tocoferoles	A-Tocoferol %
Tubérculos de papa	0,7	10
Arroz blanco	17	30
Hojas de lechuga	7	45
Hojas de espinaca	30	63
Semilla de girasol	700	96
Aceite de maíz	1000	20
Germen de trigo	2700	47

Biosíntesis

La síntesis de α -tocoferol y de otros tococromanos, se lleva a cabo en el citosol a partir de aminoácidos aromáticos para sintetizar la cabeza del grupo y, a partir de un producto proveniente de los cloroplastos, el 2-C-metil-D-eritritol-4 fosfato (MEP), para la producción del tallo o cuerpo del compuesto. En el primer caso, a partir de la vía del ácido shikímico, se obtiene hidroxifenilpiruvato, el cual produce ácido genticónico. A partir de MEP, se obtiene GGDP, que con un grupo fitilmonofosfato proveniente de un fitol, produce fitidildifosfato (PDP). El PDP se une con HGA y forma 2-metil-6-fitil benzoquinol (MPBQ). Luego, el MPBQ se transforma en α -tocoferol (Cahoon *et al.* 2003; Horvath *et al.* 2006).

Mirando hacia el futuro y con base en las cantidades variables de tocoferol en los alimentos, queda claro que se pueden alcanzar logros destacados en el mejoramiento de los productos agrícolas, mediante el incremento de las concentraciones de tocoferol. La ingeniería genética y la ingeniería metabólica son la base para poder incrementar los niveles del cofactor, sobre todo en plantas

cuyos órganos de almacenamiento y aprovechamiento sean semillas o que contengan unas cantidades altas de aceites y grasas. No obstante, no se debe desconocer que las técnicas de mejoramiento convencional han contribuido a mejorar la calidad de los alimentos y que siguen siendo herramientas muy importantes.

Carotenoides en plantas y su importancia nutricional

Con base en lo expuesto por Botella-Pavia & Rodríguez (2006), los carotenoides son isoprenoides lipofílicos sintetizados por organismos fotosintéticos, incluyendo plantas, algas y cianobacterias, pero también algunas bacterias y hongos. Se encuentran dos clases en la naturaleza: los carotenos que son hidrocarbonatos puros y las xantofilas, que contienen oxígeno. El β -caroteno, el cual ya se trató al principio del documento, tiene importancia por ser el precursor de la vitamina A. Dentro de las xantofilas, se encuentran la zeaxantina, muy especial para dar coloración al maíz, la violaxantina, la luteína y la neoxantina, entre otras.

La mayoría de carotenoides se asocian con las clorofilas y son enmascarados por éstas. Cuando los tejidos fenecen y las clorofilas son oxidadas, se puede ver los carotenoides y más aún se concentra su mecanismo de acción fisiológica (Hirschberg, 2001). Fisiológica y bioquímicamente tienen enorme interés, pues conforman la estructura fotosintética que permite la captación de luz, el transporte de electrones y la protección de fotosistemas y clorofilas para no ser fotodestruidos. La transformación oxidativa de los carotenoides da como resultado la producción de apocarotenoides, los cuales tienen una potente actividad biológica (Dawe *et al.* 2002). El ácido absísico y algunos otros fitoreguladores, aun no identificados, son los mejores ejemplos.

El principal papel de los carotenoides parece estar enmarcado en dar la coloración apropiada a las flores para atraer los polinizadores, para atracción de pájaros y así dispersar las semillas y, como complemento, dar coloración adecuada a flores y frutos para contribuir al incremento de su valor económico. Las propiedades de los carotenoides, como pigmentos agroindustriales, han sido explotadas desde hace bastante tiempo, ejemplo de ello es el uso de astaxantina y canthaxantina en la alimentación de salmones truchas y pargos para dar la coloración apropiada de su carne. Luteína y zeaxantina son usadas para dar una mejor coloración a huevos y carne de pollo, mientras que β -caroteno es usado en la coloración de margarinas (Cunningham & Gantt, 1998).

Los carotenoides para animales y para el hombre son fundamentales y mucho más que pigmentos y precursores de vitamina A. De hecho, los carotenoides actúan como precursores de la producción de retinoides, como el retinol (vitamina A), retinal (principal pigmento visual) y ácido retinoico, el cual controla aspectos morfogénicos. La deficiencia de β -caroteno en la alimentación humana es el principal problema de salud en el mundo, especialmente en países en desarrollo, causando problemas, como ceguera, xerofthalmia, muerte prematura de niños y enfermedades de las mujeres en gestación (Lucca *et al.* 2006).

Biosíntesis

Como todos los isoprenoides, los carotenoides son sintetizados de una unidad de isopreno, el isopentildifosfato (IPP) y su isómero, el dimetilalildifosfato (DMAPP). Tres moléculas de IPP forman GGDP, un precursor común de cierto grupo numeroso de isoprenoides, entre los

cuales se encuentran giberelinas, clorofilas, tocoferoles, filoquinonas y plastoquinonas. La condensación de dos GGDP genera una cadena isoprenoide poliélica con dobles enlaces conjugados para estructurar la columna vertebral de los carotenoides vegetales y determinar sus propiedades biológicas (Hirschberg, 2001). Adelantos en la ingeniería genética han permitido encontrar los efectos anticancerígenos y las propiedades antioxidantes de estos compuestos. Es así que la demanda mundial por carotenoide, de uso industria, como zeaxantina, asthaxantina, canthaxantina y bixina ha aumentado y, por ello, el especial interés en algunos productos vegetales. En tomate, se ha incrementado las cantidades de licopeno y β -caroteno, en papa tanto las variedades de *Solanum tuberosum* como las de *S. phureja* han sido empleadas para incrementar los niveles de carotenoides con relativo éxito, pero tal vez los cultivos donde el mejoramiento genético ha aportado mayores expectativas son el arroz y la canola. El arroz, en el ya comentado caso del grano "Golden Rice", mientras que en canola, se han encontrado plantas transgénicas que han incrementado los niveles de β -caroteno hasta 300 veces respecto a los testigos (Botella-Pavia & Rodríguez, 2006; Schaub *et al.* 2005).

Importancia de los glucosinolatos

Los glucosinolatos y los productos misceláneos derivados del rompimiento de su molécula fueron identificados inicialmente como aceites de coles y han despertado alta curiosidad. No solamente contribuyen al olor y al aroma característico de las especies crucíferas, sino que poseen profundas actividades biológicas, incluida su participación en mecanismos de defensa vegetal, homeóstasis auxínica, así como para la prevención del desarrollo de cáncer en humanos. Al encontrarse particularmente en Brassicaceas, grupo de plantas con varias especies de importancia económica, el estudio de estos metabolitos secundarios tiene especial interés para la agricultura (Padilla *et al.* 2007).

La estructura central de los glucosinolatos es la glucosa, la cual se deriva de un selecto grupo de aminoácidos proteicos y comprende un grupo β -tioglicosil, unido a un carbono α , para formar una cetoxima sulfatada. La extensión y la modificación de la cadena de los glucosinolatos es la responsable de la diversidad química de más de 120 estructuras reportadas. Esos compuestos hidrofílicos e inestables son almacenados en las vacuolas de los diferentes tejidos vegetales. Una enzima conocida como mirosinasa, es la responsable de romper los

glucosinolatos, mediante hidrólisis del grupo glicosídico (Chen & Andreason, 2001).

Las mirosinas son α -glucosinas localizadas en el idioblasto (células mirosin), agrupadas en diversos tejidos de las plantas productoras de glucosinolatos. Daños por agentes bióticos y/o abióticos activan el sistema binario glucosinato mirosina, algunas veces llamada la bomba de los aceites de coles, conduciendo a la formación rápida de un producto inestable llamado thiohidroxinato-O-sulfato. Posteriormente, la eliminación monoenzimática del grupo sulfato y el arreglo espontáneo del corazón de la estructura, producen una variedad de productos bioactivos incluyendo isohtiocinatos (de alta presencia en brócoli y coliflor), thiocinatos, nitrilos, oxazolidonas y epitilcanos. Las condiciones químicas, como pH, disponibilidad de iones hierro y la presencia de mirosidas, determinan la composición de la mezcla final de los productos. Algunos productos de la degradación tienen una potente actividad biocida y contribuyen ampliamente al mecanismo de defensa de las plantas; otros juegan papel como aleloquímicos en la interacción insecto-planta (Tripathi & Mishra, 2007).

Como componentes de comidas y de alimentos, los productos de la hidrólisis de los glucosinolatos tienen importancia toxicológica y farmacológica. Algunos derivados de glucosinolatos tienen propiedades antinutricionales. En la actualidad, se conoce que los isotiocinatos derivados de la metionina tienen actividad anticancerígena (Jones *et al.* 2006).

Biosíntesis

Según Fischer & Bacher (2006) y Grubb & Abel (2006), la biosíntesis de glucosinolatos se divide en tres partes: elongación de la cadena de aminoácidos, desarrollo de la estructura central y modificaciones secundarias a la cadena. La primera, se inicia con una transaminación, seguida de una condensación del ceto-ácido y la coenzima A, para formar 2-alkil malato. La metiltioalkilmalatosnitetasa cataliza esta reacción. La conformación de los dos pasos siguientes, isomerización y carboxilación, es análogo a lo encontrado en el ciclo de los ácido tricarbóxicos. El resultado es un homo cetoácido, el cual sufre una *trans* aminación para formar un homoaminoácido. Las enzimas para estas reacciones no se han identificado aún. La formación de la glucona o estructura central, toma el homo amino ácido y lo transforma en thiohidroxinato mediante dos oxidaciones seguidas y una conjugación de

con cysteina, mediante la acción de C-S lyasa. Finalmente, se forma glucosinato a partir de thio hidroximato, UDP-glucosa y una sulfatación. En las modificaciones a la cadena, se presentan sucesivas oxidaciones, mediante la acción de alkenilfosfatooxidasa, lo cual generará grupos alkenil glucósido e hidroxil glucósido.

Presencia en los alimentos

En el brócoli y coliflor la presencia de glucosinolatos reviste especial importancia, gracias a los descubrimientos que han permitido identificar a dichas plantas como atenuadores de los riesgos por cáncer de estómago, de páncreas, de hígado, de colón y de próstata (Padilla *et al.* 2007; De Pascale *et al.* 2007)). De acuerdo a las investigaciones de Jones *et al.* (2006), el 4-metilsulfinilbutil es el derivado de mayor presencia. Este compuesto de los isothiocinatos tiene importantes propiedades como anticancerígeno. En la tabla 3, se observa la composición del brócoli en cuanto a derivados de glucosinolatos. Es claro que la cocción prolongada puede afectar el contenido de estos productos, de ahí que se recomiende hervirlos durante no más de cuatro minutos para mantener sus propiedades (De Pascale *et al.* 2007).

El vino y sus componentes

Los componentes fenólicos constituyen uno de los más importantes parámetros de calidad de los vinos, pues ellos contribuyen a las características organolépticas, particularmente color, sabor y astringencia. Estos componentes, se dividen en dos grupos: no flavonoides donde se encuentran el ácido hidroxibenzoico, el ácido hidroxicinámico, los estilbenos y los alcoholes fenólicos; el otro grupo denominado flavonoides donde se encuentran las antocianinas, los flavonoles, los flavanos y los dihidroflavonoles (Monagas *et al.* 2006). Los estilbenos, así como sus polifenoles oligoméricos constituyen un grupo de sustancias naturales, las cuales son producidas como metabolitos en plantas sometidas a estrés, por lo cual, se considera que hacen parte del arsenal de defensa de los vegetales, siendo clasificados como fitoalexinas (Dourtoglou *et al.* 1999).

Trans-resveratrol (3, 5, 4-trihidroestilbeno) es una fitoalexina de la vid, que actúa como un antioxidante de lipoproteínas de baja densidad en humanos. Se encuentra en la cáscara del fruto de la uva. Su isómero el *cis*-resveratrol es poco común en condiciones naturales y su presencia es derivada de procesos químicos. Se

Tabla 3. Composición de derivados de glucosinolatos en la inflorescencia del brócoli (*Brassica oleracea* var *italica*) (Jones *et al.* 2006).

Nombre común	Nombre químico	Clase	Abundancia %
Glucorafanin	4-metilsulfinilbutil.	Alifático	55,5
Glucobrassicin	3-indolmetil	Indolil	8,6
Gluconapin	3-butenil	Alkenil	7,8
Prpgoitin	(2R) 2-hidroxi-3-butenil	Alkenil	7,8
Napoleiferin	2-hidroxi-4-pentilil	Indolil	5,5
4-metoxiglucobrassicin	4-metoxi-3indolmetil	Indolil	3,1
Gluconasturtin	2-feniletil	Aromático	3,1
Glucobrassicinapin	4-pentilil	Indolil	2,3
Glucoalisin	5-Metilsulfinilpentil	Alifático	1,6
Neoglucobrassin	N-metoxi-3-indolmetil	Indolil	1,6

identificó inicialmente en tejidos afectados por infecciones de los hongos *Botrytis cinerea* y *Plasmophora viticola*. La presencia de *trans*-resveratrol en vinos es especialmente importante por sus características antiinflamatorias y anticoagulantes, las cuales pueden proteger contra arteriosclerosis y enfermedades coronarias. Las concentraciones de la fitoalexina son mayores en vinos rojos procesados a partir de la maceración de la cáscara de la uva, mientras que se han encontrado bajas concentraciones en vinos blancos obtenidos de la fermentación de pulpas. Las variedades de vid, las

condiciones climáticas, las prácticas culturales y el añejamiento en toneles de roble también afectan los niveles del estilbeno en el producto final.

Si se tiene en cuenta que en el mundo una de cuatro personas puede padecer de algún tipo de cáncer es importante pensar en el uso del resveratrol como un agente quimiopreventivo de dicha enfermedad, pues bloquea la agregación de plaquetas, lo cual permite también disminuir los riesgos por ataques cardíacos y leucemia (Gerogianaki *et al.* 2006). En la tabla 4, se puede observar

Tabla 4. Contenido de *trans*-resveratrol en clases de vinos. Datos tomados de Geragijnaki *et al.* (2006).

VARIEDAD	TIPO	<i>Trans</i> -Resveratrol en mg l ⁻¹
Savatiano	Blanco	0,571
Muskat De Alejandria	Blanco	0,015
Vilana	Blanco	0,211
Cabemet	Rojo	0,741
Agiorgitico	Rojo	1,213
Mantilaria	Rojo	1,991

los contenidos de *trans*-resveratrol en algunas variedades de vid y las características de los vinos.

Café y chocolate, dos bebidas de alto impacto

El café y el chocolate son dos de las bebidas de origen natural más importantes en el mundo. Esta importancia es mayor si se tiene en cuenta la participación de los productos base de las bebidas en la economía colombiana. Los contenidos de cafeína y theobromina en las bebidas los han puesto en la mira de muchos contradictores, pero también de varios defensores de sus propiedades.

El cacao y su derivado el chocolate, desde tiempos precolombinos han sido considerados alimentos de gran valor energético y nutricional en la dieta de los habitantes de las culturas meso Americanas. Recientemente, se ha descubierto que pueden ser otras fuentes de *trans*-resveratrol, diferentes a los vinos tintos (Counet *et al.* 2006). Este aspecto es de vital importancia, debido a que el consumo de chocolate puede mejorar la condición saludable de los humanos, especialmente para evitar enfermedades de tipo coronario.

La cafeína (1,3,7 trimetilxantina) es uno de los pocos productos vegetales, con los cuales la mayoría de población está familiarizada, debido a la presencia de ella en algunas bebidas, como té, café y algunas gaseosas. Un concepto creciente, basado en los efectos adversos de la cafeína en la salud humana, ha disparado el consumo de productos llamados descafeinados (Parras *et al.* 2007; McCusker *et al.* 2006). El consumo de cafeína, produce entre otras cosas, palpitaciones excesivas, desórdenes gastrointestinales, ansiedad, temor, incremento en la presión sanguínea e insomnio (Ashinara & Crozier, 2001). Descubierta inicialmente en el té (*Camellia sinensis*) y café (*Coffea arabica*) hace parte del grupo de las mehtilxanthinas, junto con la theobromina del cacao, paraxantina y ácido metil úrico, conocidos como los alcaloides de purina (Zheng *et al.* 2004). Los alcaloides de purina están también presentes en hojas de mate (*Ilex paraguarienses*), guaraná (*Paulliana cupana*), cola (*Cola nitida*), en flores de cítricos y en metabolitos de hongos, como el caso de los esclerocios de *Claviceps purpurea*.

Biosíntesis de los alcaloides de purina

La xantosina es el compuesto purínico inicial para la síntesis de cafeína, actuando como un sustrato del

grupo methyl donado por S-adenosil-Methionina (SAM). Producto de esto, se obtiene la 7-methylxantosina, luego 7-methylxantina, thebromina y finalmente cafeína, aunque algunas rutas alternas de menos ocurrencia pueden darse. Una vez alcanzada la síntesis de cafeína, la xantosina se convierte en xantina para ser degradada a CO₂ y NH₃, como vía catabólica (Ashinara & Crozier, 2001; Koyama *et al.* 2003).

CONCLUSIONES

Para realizar aportes al problema de la seguridad alimentaria mundial, en especial en los países en vía de desarrollo, es importante pensar en estrategias económicas y a largo plazo. Una de las posibilidades radica en la biofortificación de alimentos que hacen parte de la cultura de los pueblos y el mejoramiento de la calidad de los mismos. La transgénesis, la biotecnología y la fotoquímica, se deben unir e integrar para producir alimentos cada vez más completos y menos nocivos para la salud humana.

En el mundo existen muchos trabajos sobre mejoramiento de la calidad de los alimentos base de la población humana, pero lamentablemente la información no llega a los puntos neurálgicos de la tecnología, a los gobiernos y las entidades responsables de las políticas alimentarias.

Se debe mirar con bastante detalle las costumbres de los pueblos y con base en ellas aplicar los adelantos científicos que, en términos de metabolismo secundario y alimentos, se han expuesto en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- AL-BABILI, S.; BEYER, P. 2005. Golden Rice-five years on the road-five years to go? Trends Plant Sci. 10(12):565-572.
- ASHINARA, H.; CROZIER, A. 2001. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. Trends Plant Sci. 6(9):407-414.
- BACHER, A.; EBERHARDT, S.; FISHER, M.; KIS, K.; RICHTER, G. 2000. Biosynthesis of vitamin B₂ (riboflavin). Ann. Rev. Nutr. 20:153-157.

- BASSET, G.J.C.; QUINLIVA, E.P.; GREGORY, J.F. III.; HANSON, A.D. 2005. Folate synthesis and metabolism in plants and prospects for biofortification. *Crop Sci.* 45:449-453.
- BOUIS, H.E. 2003. Micronutrient fortification in plants through plant breeding. Can it improve nutrition in man at low cost? *Proc. Nutr. Soc.* 62:403-411.
- BOTELLA-PAVIA, P.; RODRÍGUEZ, C.M. 2006. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiol. Plant.* 126:269-381.
- CAHOON, E.B.; HALL, S.E.; RIPP, K.G.; GANZKE, T.S.; HITZ, W.D. 2003. Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nat. Biotech.* 21:1082-1087.
- CHAKAUYA, E.; COXON, K.; WHITNEY, H.M.; ASHURRST, J.L.; ABEL, C.; SMITH, A.G. 2006. Pantothenate biosynthesis in higher plants: advances and challenges. *Physiol. Plant.* 126:319-329.
- CHEN, S; ANDREASSON, E. 2001. Update on glucosinolate metabolism and transport. *Plant Physiol. Biochem.* 39:743–758
- CONKLIN, P.L. 2001. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant Cell Environ.* 24:383-394.
- COSSINS, E.A.; 2000. The fascinating world of folates and one carbon metabolism. *Can. J. Bot.* 78:691-708.
- COUNET, C.; CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. 2006. Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chem.* 98(4):649-657.
- CUNNINGHAM, F.X.; GANTT, E. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 557-583.
- DATTA, K.; BAISAKH, N.; OLIVA, N.; TORRIZO, L.; ABRIGO, L. 2003. Bioengineered "golden" indica rice cultivars with β -carotene metabolism in the endosperm with hygromycin and mannose selection systems. *Plant Biotech. J.* 1:81-90.
- DAWE, D.; ROBERTSON, R.; UNNEVERTH, L. 2002. Golden rice: what role could it play in alleviation of vitamin A deficiency? *Food Policy* 27:541-560.
- DELLA PENNA, D.; LAST, R. 2006. Progress in the dissection and manipulation of plant vitamin E biosynthesis. *Physiol. Plant.* 126:356-368.
- DE PASCALE, S.; MAGGIOA, A.; PERNICE, R.; FOGLIANO, V; BARBIERI, G. 2007. Sulphur fertilization may improve the nutritional value of *Brassica rapa* L. subsp. *sylvestris*. *Eur J. Agron.* 26:418-424.
- DOURTOGLOU, V.G.; MAKRIS, D.P.; BOIS-DONNAS, F.; ZENOAS, C. 1999. Trans-Resveratrol concentration in wines produced in Greece. *J. Food Comp. Anal.* 12:227-233.
- DUHAN, A.; KHETARPAUL, N.; BISHNOI, S. 2002. Content of phytic acid and HCl-extractability of calcium phosphorus and iron as affected by various domestic processing and cooking methods. *Food Chem.* 78:9-14.
- FISCHER, M.; BACHER, A. 2005. Biosynthesis of flavo-coenzymes. *Nat. Prod. Report.* 22:324-350.
- FISCHER, M.; BACHER, A. 2006. Biosynthesis of vitamin B₂ in plants. *Physiol. Plant.* 126:304-318.
- GEROGIANNAKI, M.; ATHANASOPOULOS, P.; KYRIAKIDIS, N.; GEROGIANNAKI, E.; SPANOS, M. 2006. *Ttrans-resveratrol* in wine from the major greek red and white grape varieties. *Food Cont.* 17:700-706.
- GHANDILYAN, A.; VREUGDENHIL, D.; AARTS, M.G. 2006. Progress in the genetic understanding of plant iron and zinc nutrition. *Physiol. Plant.* 126:407-417.
- GRUBB, C.D.; ABEL, S. 2006. Glucosinolate metabolism and its control. *Trends Plant Sci.* 11(2):89-91.
- HANSON, A.D.; ROJE, S. 2001. One-carbon metabolism in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol* 52:119-137.

- HANSON, A.D.; GREGORY, J.F. 2002. Synthesis and turnover of folate in plants. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 5:244-249.
- HESS, J.L. 1993. Vitamin E, tocopherol. En: Alscher, R.; Hess, J. edits. *Antioxidants in higher plants*. CRC Press Boca Ratón, p.111-134.
- HIRSCHBERG, J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:210-218.
- HORVATHA, G.; WESSJOHANNB, L.; BIGIRIMANAC, J.; MONICAC, H.; JANSEND, M.; GUISEZA, Y.; CAUBERGSA, R.; HOREMANSA, N. 2006. Accumulation of tocopherols and tocotrienols during seed development of grape (*Vitis vinifera* L. cv. Albert Lavallée). *Plant Phys. Biochem.* 44:724-731.
- ISHIKAWA, T.; DOWDLE, J.; SMIRNOFF, N. 2006. Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiol. Plant.* 126:343-355.
- JAIN, A.K.; NESSLER, C.L. 2000. Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid in plants and animals. *Mol. Breed.* 6:73-78.
- JOHNS, T.; EYZAGUIRRE, P.B. 2007. Biofortification, biodiversity and diet: A search for complementary applications against poverty and Malnutrition. *Food Pol.* 32:1-4.
- JONES, R.B.; FARAGHER, J.D.; WINKLER, S 2006. A review of the influence of postharvest treatments on quality and glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) heads. *Postharvest. Biol. Tech.* 41:1-8.
- KING, J.C. 2002. Evaluating the impact of plant biofortification on human nutrition. *J. Nutr.* 132:511-513.
- KOYAMA, Y.; TOMODA, Y.; KATO, M.; ASHIHARA, H. 2003. Metabolism of purine bases, nucleosides and alkaloids in theobromine-forming *Theobroma cacao* leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 41:997-984.
- KUPKE, T.; HERNÁNDEZ-ACOSTA, P.; CULIÁÑEZ-MACIA, F. A. 2003. A-phosphopanteteina and coenzyme A biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 278:38229-38237.
- LOEWUS, F.A. 1999. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochem.* 52:193-210.
- LUCCA, P.; POLETTI, S.; CAUTTER, C. 2006. Genetic engineering approaches to enrich rice with iron and vitamin A. *Physiol. Plant.* 126:291-303.
- LÓPEZ, M.A.; MARTOS, F.C. 2004. Iron availability: An updated review. *Internal. J. Food Sci. Nutr.* 55:597-606.
- MCCUSKER, J.; RACHEL R.; FUEHRLEIN, B.; GOLDBERGER, B.A.; GOLD, M.S.; CONE, E. 2006. Caffeine content of decaffeinated coffee. *J. Anal. Tox.* 30(8):611- 613.
- MENG, F.; WEI, Y.; YANG, X. 2005. Iron content and bioavailability in rice. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18:333-338.
- MONAGAS, M.; GÓMEZ, C.C.; BOGOÑA, B. 2006. Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chem.* 95:405-412.
- MOUILLON, J.M.; RAVANEL, S.; DOUCE, E.; REBEILLE, F. 2002. Folate synthesis in higher-plant mitochondria: coupling between the dihydropterin pyrophosphokinase and the dihydropterolate synthase activities. *Biochem. J.* 363:313-319.
- OLTMANS, S.E.; FEHR, W.R.; WELKE, G.A.; RABOY, V.; PETERSON, K.L. 2005. Agronomic and seeds traits of soybean lines with low-phytate phosphorus. *Crop Sci.* 45:593-598.
- PADILLA, G.; CARTEA, M.E.; VELASCO, P.; DE HARO, A.; ORDÁS, A. 2007. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa*. *Phytochem.* 68(4):536-545.
- PALLANCA, J.E.; SMIRNOFF, N. 2000. The control of ascorbic acid synthesis and turnover in pea seedlings. *J. Exp. Bot.* 51:669-674.
- PARRAS, P.; MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; JIMÉNEZ, A.M.; MURCIA, M.A. 2007. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. *Food Chem.* 102(3):582-592.

- QUINLIVAN, E.P.; MC PARLIN, J.; MCNULTY, H.; WARD, M.; STRAIN, J.J.; WEIR, D.G. 2002. Importance of both folic acid and vitamin B₁₂ in reduction of risk of vascular disease. *Lancet*. 359:227-228.
- RAVANEL, S.; CHEREST, H.; JABRIN, S.; GRUNWALD, D. 2001. Tetrahydrofolate biosynthesis in plants: molecular and functional characterization of dihydro folate synthetase and three isofoms glutamate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98:15360-15365.
- RATHINASABAPATHI, B.; RAMA, S.B. 2005. Exogenous supply of pantonyl lactone to excised leaves increases their pantothenate levels. *Ann. Bot.* 95:1033-1037.
- RÈBEILLÈ, F.; RAVANEL, S.; JABRIN, S.; DOUCE, R.; STOROZHENKO, S.; VAN DER STRATEN, D. 2006. Folates in plants: biosynthesis, distribution and enhancement. *Physiol. Plant.* 126:330-342.
- SCHAUB, P.; AL-BABILLI, S.; DRAKE, R.; BEYER, P. 2005. Why is golden rice yellow instead of red? *Plant Physiol.* 138:441-450.
- SCHNEIDER, C. 2005. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol. Nutr. Food Res.* 49:7-30.
- SCHRAMMEK, N.; BRACHER, A.; BACHER, A. 2001. Biosynthesis of riboflavin. Single turnover kinetic analysis of GTP cyclohydrolase II. *J. Bio. Chem.* 276:44157-44162.
- SMIRNOFF, N. 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi faceted molecule. *Current Op. Plant Biol.* 3:229-235.
- TRABER, M.G. 2005. Vitamin E regulation. *Current Op. Gastroenterology* 21:223-227.
- TRIPATHI, M.K.; MISHRA, A.S. 2007. Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Anim. Feed Sci. Tech.* 132(1,2):1-27.
- USDA. 2004. USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Disponible desde Internet en: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search> (con acceso 12/05/06).
- WEBB, M.B.; SMITH, A.G.; ABELL, C. 2004. Biosynthesis of pantothenate. *Nat. Prod. Rep.* 21:695-721.
- WELCH, R.M.; GRAHAM, R.D. 2004. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *J. Exp. Bot.* 55:353-364.
- WHITE, P. J.; BROADLEY, M.R. 2005. Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends Plant Sci.* 10(12): 586-593.
- XIAO, L.Y.; WU, P.; LING, H.Q.; XU, G.H.; XU, F.; ZHANG, Q. 2006. Plant nutriomics in China: An Overview. *Ann. Bot.* 98(3):473-48.
- ZHENG, X-Q.; KOYAMA, Y.; NAGAI, C.; ASHIHARA, H. 2004. Biosíntesis, acumulation and degradation of theobromine in development *Theobroma cacao* fruits. *J. Plant Physiol.* 161:363-369.

Recibido: Noviembre 27 de 2006

Aceptado: Mayo 9 de 2007

CARACTERIZACIÓN DEL SUBSECTOR DE LA ALFARERÍA Y CERÁMICA EN LOS MUNICIPIOS DE RÁQUIRA Y LA CHAMBA PARA LA COMERCIALIZACIÓN INTERNACIONAL DE ARTESANÍAS COLOMBIANAS

CHARACTERIZATION OF THE POTTERY AND CERAMIC SUBSECTOR FOR THE INTERNATIONAL COMMERCIALIZATION OF COLOMBIAN HANDICRAFTS IN THE MUNICIPALITIES OF RAQUIRA AND THE CHAMBA

Álvaro Lamprea Delgado ¹

RESUMEN

La ausencia de conocimiento por parte de los artesanos y de sus organizaciones sobre el desarrollo de estrategias de comercialización a nivel nacional e internacional ha impedido el crecimiento y la mejora en la competitividad del subsector. Por lo anterior, se requiere de la creación y la expansión de empresas con mentalidad y conciencia exportadora y la necesidad de mejorar la cadena productiva para garantizar un constante suministro de productos que faciliten cumplir con los pedidos en el exterior. Se debe transformar el sistema tradicional de producción en uno más productivo permitiéndoles competir y acceder a los mercados internacionales, así como crear mecanismos que promuevan procesos de producción y comercialización, a una escala sostenible y viable. El estudio efectuado en los municipios de mayor producción cerámica del país, Ráquira, en el departa-

mento de Boyacá y La Chamba, en el departamento del Tolima, desarrolló la caracterización y la descripción del sector. Esta es una investigación aplicada de carácter cuantitativo y cualitativo de tipo histórico, en la cual se examinaron aspectos como el análisis del sector y del producto artesanal, la determinación y la priorización de factores relevantes, análisis dofa y la fijación de objetivos estratégicos de acuerdo a las perspectivas. Se buscó describir y discutir los avances y los desarrollos del subsector para aumentar la oferta exportable de artesanías de productos cerámicos y/o alfareros, que logren un alto impacto en la generación de empleo y la consecución de divisas y que mejoren el nivel de vida de los artesanos.

Palabras clave: Artesano, caracterización, comercialización internacional, cerámica, alfarería.

SUMMARY

The lack of knowledge by handicraftsmen and their organizations about the development of commercial-

¹ Profesional en Comercio Internacional, Especialista en Gerencia de Mercadeo, Docente Investigador, Ingeniería Comercial, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A. Dirección para correspondencia e-mail: alamprea@udca.edu.co

ization strategies at national and international level has hindered the growth and improvement of the competitiveness of this artisan subsector. Therefore, the creation and development of companies with exportation mentality and consciousness and the necessity to improve the productive chain to guarantee a constant product flux to fulfill the external demands is necessary. The traditional system has to be transformed in a more productive and competitive one to grant to compete and to accede to international markets, as well as to develop strategies that promote production processes at a sustainable and viable scale. The study, carried out in the municipalities of the main ceramic production in the country, "Ráquira", in the department of Boyaca and "The Chamba", in the department of Tolima, developed the characterization and description of the subsector. In this applied research of quantitative and qualitative historical type, aspects such as the sector's and artisan's products analysis, the determination and prioritization of relevant factors, a Dofa analysis and the fixation of strategist objectives were examined. The evolution and development of the subsector was described and discussed in order to increase the exportable supply of ceramic products and attain a high impact in the generation of employment and consecution of holdings and therefore in the quality of life of the handicraftsmen.

Key words: handicraftsmen, characterization, international commercialization, pottery, ceramics.

INTRODUCCIÓN

Los municipios de Ráquira y La Chamba fueron los principales centros olleros indígenas del país y en la actualidad preservan parte de las técnicas originarias de sus antepasados, logrando que sus artículos tengan un importante valor cultural y comercial. La producción artesanal, se desarrolla en zonas rurales y urbanas, teniendo su origen en parcelas campesinas que generan ingresos insuficientes y absorben la mano de obra familiar creando una producción manufacturera incipiente (Artesanías de Colombia, 1999). La producción urbana, se promueve en empresas familiares y, excepcionalmente, en empresas asociativas, tipificadas por una baja capacidad administrativa, principalmente por ser el artesano, quien desarrolla todas las actividades en su taller (Delgado, 2001). Adicionalmente, se caracteriza por una baja acumulación de capital, falta de innovación

tecnológica e imperfecciones en los procesos productivos y en los productos (Rodríguez, 2001), factores que dificultan la inserción de estas pequeñas unidades en una economía competitiva, cada vez más globalizada y exigente.

Con el presente estudio, se pretendió caracterizar y analizar este subsector para proporcionar las bases para la construcción de un modelo de comercialización internacional y aumentar la oferta exportable de artesanías de productos cerámicos y/o alfareros, con un alto impacto en la generación de empleo y la consecución de divisas, para mejorar el nivel de vida de los artesanos del subsector cerámico en Colombia. Para esto, se escogió el sector de los municipios de Ráquira (Boyacá) y La Chamba (Tolima).

El municipio de Ráquira ha venido trabajando en diferentes programas de formación empresarial, con el fin de alcanzar un mejor desarrollo del subsector (Ministerio de Desarrollo Económico, 1998a). Algunas de los logros obtenidos fueron el interés de los artesanos por aumentar la producción con excelente calidad para los mercados externos, a través de alianzas estratégicas, la conciencia sobre la necesidad de unir esfuerzos para alcanzar la competitividad y la disposición para constituir la asociación de exportadores de Ráquira; un mayor interés en torno al tema de la contaminación y la participación en la rueda de negocios con compradores.

La diferencia entre el comportamiento de la artesanía rural y la urbana es notoria, en las veredas esta actividad es considerada como una ocupación secundaria, figurando la agricultura como una actividad principal (Benavides, 1997), mientras que en el casco urbano los artesanos se dedican exclusivamente al trabajo de la cerámica. Ellos cuentan con técnicas y formas de producción cada vez más sofisticadas, ya que tienen acceso a medios que les facilita el desarrollo de su actividad. Generalmente son los hombres quienes dirigen los talleres, los cuales cuentan con mano de obra ocupada y no perteneciente a la familia (Delgado, 2001).

En cuanto a la producción, una de las dificultades es el aspecto laboral, debido a que la mano de obra ocupada carece de participación constante en el proceso. De los seis días normales de trabajo, solamente laboran cuatro, lo cual perjudica enormemente la producción (Urrutia, 1971). En los últimos años, se está presentando el caso

de traslado de la producción de las veredas al centro del Municipio, creándose así mayores fuentes de empleo.

En la segunda zona, objeto de estudio, La Chamba (Tolima), donde se han desarrollado importantes proyectos para crear y organizar la cadena productiva de la cerámica, obteniendo logros más exitosos que en el municipio de Ráquira. Entre las ventajas más importantes, se destacan la asociatividad y la consecución de la materia prima, el barro que se extrae de una mina propiedad de la comunidad y lo cual redundo en unos menores costos. La mayoría de talleres son administrados por mujeres, siendo éste quizás uno de los factores que incide en el mayor nivel de asociatividad en La Chamba. Es un importante centro de producción que trabaja la cerámica desde 1930, siendo una de sus características más notorias y favorables los colores y los diseños de sus productos. Existe la producción con diseños tradicionales, pero además se están impulsando nuevos diseños por solicitud de sus clientes, los intermediarios (Navarro, 2001). Las actividades artesanales, se combinan con otras labores, como el jornaleo agrícola, el comercio y la sastrería, que complementan el sustento de la unidad familiar. Dada la importancia de la agricultura durante las épocas de siembra y de la cosecha, se denota una baja en la mano de obra (Rojas, 1984).

El estudio realizado fue aplicado, cuantitativo y cualitativo de tipo histórico. Se determinó la evolución y el auge de la oferta exportable de los productos cerámicos. Además, se buscó conocer si el impacto generado en el crecimiento de la producción mejora la calidad de vida de los artesanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

En Ráquira, se realizaron 30 encuestas y 30 entrevistas personales en profundidad a los artesanos, en las cuales se analizaron principalmente la producción y las ventas directas o indirectas efectuadas hacia los mercados internacionales. Las encuestas, se aplicaron en las veredas de El Centro (nueve talleres), Pueblo Viejo (diez talleres), Candelaria (dos talleres), Santa Bárbara (tres talleres) y los Pinos (tres talleres). Todos los artesanos encuestados en este municipio, se dedican exclusivamente a la actividad artesanal cerámica.

En La Chamba, se efectuaron sondeos y 25 entrevistas en profundidad. Se tuvieron en cuenta principalmente

aspectos como el taller, la actividad, el número de empleados, el ingreso y la actividad exportadora. Respecto a este último punto, se buscó conocer el porcentaje de la producción que se dedica hacia la exportación, los países destino, la periodicidad en compras para exportaciones, los vínculos gremiales o asociativos, los tipos de productos, los canales de distribución, la competencia, la logística, el proceso de producción y el diseño. Un alto porcentaje de los lugares de trabajo analizados son de propiedad de las artesanas, así que en cada vivienda existe una unidad de producción, lo que significa un lento aumento de nuevas unidades productivas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción y análisis del subsector cerámico / alfarero en el municipio de Ráquira: El análisis de las encuestas demostró que los ingresos para los 30 talleres no incrementaron significativamente al aumentar la producción y tampoco mejoró sustancialmente la calidad de vida de los artesanos. El desarrollo de las exportaciones de productos cerámicos y/o alfareros no ha beneficiado directamente al artesano - productor. Como se observa en el Cuadro 1, el máximo ingreso corresponde a ocho salarios mínimos mensuales, obtenidos por tres talleres, mientras que tres talleres subsisten con medio salario mínimo. Se destaca que, tanto los talleres con mayores ingresos, así como los de menores ingresos, son manejados por sus propietarios, lo cual indica una posible falta de disposición de técnicas y de tácticas de producción y de comercialización de los artesanos de bajos ingresos.

Los intermediarios minoristas y mayoristas que acopian las mercancías en la zona, para luego distribuirlas a los diferentes mercados locales y ocasionalmente para su exportación, se reducen a seis comerciantes. De ellos, uno comercializa gran parte de la producción, por que cuenta con mano de obra disponible y transporte propio. La calidad y los diseños de los productos cerámicos son dos aspectos esenciales e importantes que determinan el valor del producto por su diseño original. En México, por ejemplo (Estage, 1998), la característica "hecho a mano" proporciona una valoración artística y monetaria a los productos, lo mismo ocurre en Ráquira.

Los aspectos de diversificación, las economías de escala y la variedad de líneas de productos están siendo muy

Cuadro 1. Ingresos de los artesanos medidos en Salario Mínimo Legal (S.M.L.) año 2004 (Ráquira).

S.M.L.*	Número de Talleres	Propietario del taller	
		SI	NO
0,5 S.M.L.	3	3	-
1 S.M.L.	6	4	2
1,5 S.M.L.	3	3	-
2 S.M.L.	9	8	1
2,5 S.M.L.	6	6	-
8 S.M.L.	3	3	-
TOTALES	30	27	3

Encuesta U.D.C.A, 2004

descuidados, lo que afecta el precio. Se venden volúmenes, pero no calidad y creatividad, como parte del valor agregado. Los productores no cuentan con un método adecuado para calcular los costos de producción, ni su margen de utilidad. La producción en las veredas, en muchas ocasiones, es una labor irregular que no genera los ingresos necesarios (Cuadro 1) para cubrir las necesidades básicas, como ya lo había detectado Fonseca (1985) y lo cual no ha sufrido cambio sustancial en los últimos 20 años. Además, el precio de venta, establecido de acuerdo con la oferta y la demanda del mercado, no permite una acumulación de capital y de excedentes para reinvertir y lograr beneficios.

Los precios son impuestos por los intermediarios mayoristas, sin tener en cuenta los costos de producción de cada taller y con frecuencia el comprador, es decir, un mayorista, determina el precio de los productos por debajo del costo de producción. El artesano, ante esta situación, se tiene que someter (Ministerio de Desarrollo Económico, 1998a), de lo contrario, se le dificultará vender sus productos. El 71% (21 artesanos) vende su producto a los compradores mayoristas, el 19% (seis artesanos), a los minoristas que acopian la mercancía para ser vendida en los almacenes ubicados en la ciudad y 10% (tres artesanos) utiliza la modalidad de venta directa a pequeños compradores, generalmente, turistas. Esta operación, se realiza en el mismo lugar de trabajo, favoreciendo al artesano quien no descuida así la producción.

Los principales países destino de las exportaciones de productos cerámicos y alfareros son los Estados Unidos, Aruba, Israel, Panamá y Ecuador. A través de la Asociación de Artesanos ASOAGUABUENA, se pudo corroborar que sí existe demanda para este tipo de productos para fines de exportación. Esta asociación participó en MANOFACTO 2002, feria de artesanos organizada por Artesanías de Colombia, en la "Plaza de los Artesanos", en el mes de agosto de 2002, en la ciudad de Bogotá, consiguiendo potenciales compradores en el exterior, entre los cuales se destacaron Estados Unidos, Canadá, Israel y Costa Rica, pero no se cumplió con la demanda, debido al manejo inadecuado de la negociación, pues los artesanos no se responsabilizaron por los compromisos adquiridos. Adicionalmente, cada taller costaba con diferentes precios de venta y costos distintos, lo cual no permitió unificar, de manera organizada, los pedidos.

Como se observa en el Cuadro 2 los artesanos destinan parte o la totalidad de su producción a la exportación. Ningún taller la realiza en forma directa, pues todos dependen y lo hacen a través de los comercializadores mayoristas quienes les compran a precios bajos parte de la producción con destino a los mercados internacionales. Lo anterior genera un alto grado de insatisfacción y frustración entre los artesanos, que aspiran a lograr mayores ventas y, por ende, mejorar sus ingresos.

Las materas en sus diferentes tamaños, diseños y formas, como ya lo detectó Villareal (2000), constituyen

Cuadro 2. Potencial de la actividad exportadora de artesanías (Ráquira)

PORCENTAJE DE LA PRODUCCION DEDICADA A EXPORTAR *	Número de Talleres	ACTIVIDAD EXPORTADORA	
		SI (INTERMEDIARIOS)	NO
0%	6		6
10%	3	3	
50%	6	6	
80%	12	12	
100%	3	3	
TOTAL	30	24	6

Encuesta U.D.C.A, 2004

*Compras hechas por comercializadores para exportar. Año 2004

uno de los productos con mayor demanda, por lo cual, gran porcentaje de talleres se dedica exclusivamente a su producción, sin embargo insuficiente para cubrir las necesidades del mercado, en términos de calidad, de diseño y de entregas a tiempo. Se detecta la especialización alcanzada por algunos talleres en cuanto a una línea de producción, como es el caso de las materas. Finalmente, en Ráquira, el 60% (18 talleres) utiliza el 100% de su capacidad instalada, identificándose como pequeñas unidades de producción. Un 40% (12 talleres) necesita recursos para poder aprovechar la capacidad productiva existente, ya sea por la falta de consecución de materias primas o el acondicionamiento del taller para una línea determinada de productos.

Descripción del subsector cerámico, alfarero en La Chamba – Tolima: En la medida en que el sector artesanal se transforma en una actividad empresarial, se requiere de economías de escala que permitan alcanzar los volúmenes necesarios y las calidades requeridas por los comercializadores. Esto ha implicado un lento proceso de especialización, lo cual se ve reflejado en la necesidad que han tenido de contratar en promedio dos empleados por taller (Soto, 1989). Así mismo, existe una división de trabajo femenino por edad, de tal manera que la fase inicial o el modelado es realizado por mujeres adultas, mientras que el proceso del brillado, lo efectúan en su mayoría, mujeres de poca edad. Esta táctica, se ha constituido en una forma de relacionar a las personas jóvenes con la producción y fomentar el aprendizaje.

El aumento en la demanda de productos artesanales de La Chamba ha generado mayores ingresos para algunos talleres, así que la actividad exportadora implica, en algunos casos, una mejora en la calidad de vida. Sin embargo, como se consignó en el Cuadro 3, que muestra los ingresos de los talleres encuestados, solamente uno de ellos muestra ingresos de ocho S.M.L. mensuales, mientras que el 44% de los talleres se conforman con un S.M.L. y, probablemente, dependen de otras actividades para sobrevivir.

Es importante recalcar que en La Chamba, hay algunos artesanos que cuentan con un mayor nivel de escolaridad que en Ráquira. Lo anterior implica que ellos comienzan a darle importancia a la educación como parte esencial de la formación de sus hijos, para tener “un mejor futuro y mayores oportunidades”. Por lo anterior, quizás algunos de estos nuevos artesanos se convertirán en una generación distinta, con nuevas ideas, generando sinergias entre el artesano tradicional “sus padres” y los nuevos artesanos que cuentan con conocimientos técnicos para mejorar los procesos de producción, de comercialización y de administración.

La experiencia empírica unida al conocimiento de los artesanos jóvenes da excelentes resultados. Es el caso de la artesana Liliana Betancourt que estudió siete semestres de contaduría, y quién combina su formación con la de su madre que lleva 58 años en el oficio de artesana. Ellas se han convertido en líderes, generando empleo

Cuadro 3. Ingresos de los artesanos medidos en Salario Mínimo Legal (S.M.L.) año 2004 (La Chamba).

S.M.L.*	Número de Talleres	Propietario del taller	
		SI	NO
1 S.M.L.	11	10	1
1,5 S.M.L.	4	4	
2 S.M.L.	5	5	
2,5 S.M.L.	4	4	
8 S.M.L.	1	1	
TOTALES	25	25	

Encuesta U.D.C.A, 2004

a través de un modelo de asociatividad promovido por la comunidad de artesanas que, conjuntamente con Artesanías de Colombia, les está ayudando a promover sus productos en el exterior.

En cuanto a los canales de distribución ocurre lo mismo que en Ráquira, es decir, en su mayoría los intermediarios comercializan los productos. Por este hecho, el 76% de las artesanas les venden sus productos en el mismo lugar de trabajo, haciendo énfasis en las facilidades existentes para este proceso. Un 15% de artesanos (esposos), se dedican a la comercialización y para ello se trasladan a diferentes lugares del país a participar en ferias artesanales, representando para ellos mayor utilidad que venderlos en la misma comunidad. Se debe tener en cuenta que algunos de los intermediarios presionan a las artesanas a que les dejen el producto a crédito por 30 y hasta 60 días, lo cual disminuye las utilidades esperadas y el pago oportuno de los productos. Es importante mencionar la dificultad de las artesanas para calcular los precios de venta y su margen de utilidad, el mismo que no llega a imponerse en el momento de la operación comercial. Por lo anterior, la determinación de los precios está beneficiando a los intermediarios y a los dueños de almacenes, más no a los productores. Se destaca que el precio de venta al por menor en el punto de venta en almacenes especializados tiene un aumento de hasta el 80% en comparación con el precio de compra a los artesanos en el punto de producción. De allí, se deduce la necesidad de implementar un programa de comercialización, creando precios de sustentación, que

beneficien a todos los artesanos y, además, incentivar el mejoramiento de la calidad de los productos.

Algunos artesanos a través de empresas de comercialización internacional están exportando sus productos bimensual o semestralmente. Para ello llega un contenedor hasta La Chamba a cargar los productos para evitar daños y deterioros en el envío. Igualmente, se está mejorando el empaque y el embalaje, los cuales con anterioridad eran hojas o afrechos del bosque, mientras que ahora se empaquetan de manera individual, lo cual protege y preserva la calidad, evitando pérdidas en el puerto de llegada. Sin embargo, se presentan averías cuando la aduana revisa la mercancía.

Las artesanías de la Chamba ya son conocidas en muchos países por su belleza y calidad. En el Cuadro 4, se observa que el 84% los talleres ya tiene pedidos para exportar. Se han creado modelos de asociatividad, pues un solo artesano no puede cumplir con la totalidad de los mismos. Los principales países destino de las exportaciones son Estados Unidos, Canadá, Grecia, Holanda, Alemania, Inglaterra, Israel y Panamá.

Cabe anotar que distintas cadenas de almacenes, como The Pottery, en la ciudad de Bogotá y Habitat, en Londres, les han hecho compras representativas, cuyas negociaciones han sido exitosas, teniendo en cuenta que en La Chamba sí ha sido posible cumplir con la demanda, ya que existe un buen nivel de asociatividad y compromiso por parte de los artesanos, quienes cumplen con los

Cuadro 4. Potencial actividad exportadora de artesanías (La Chamba)

PORCENTAJE DE LA PRODUCCIÓN DEDICADA A EXPORTAR *	Número de Talleres	ACTIVIDAD EXPORTADORA	
		SI (INTERMEDIARIOS)	NO
0%	4	4	
10%	1	1	
50%	3	3	
80%	5	5	
100%	12	12	
TOTAL	25	25	

Encuesta U.D.C.A, 2004

*Compras hechas por comercializadores para exportar. Año 2004

pedidos a tiempo y con las calidades requeridas, caso contrario a lo sucedido en el municipio Ráquira.

La asociatividad ha sido viable entre grupos pequeños de 5 a 20 artesanos que conforman unidades productivas, pero no representa la mayor parte de los artesanos. Lo anterior, ha generado un alto grado de insatisfacción en quienes no se vincularon a la asociación. Falta mucho por hacer, pues aunque los beneficios esperados en la actualidad aún no son distribuidos para la mayoría de la población artesanal, este es un buen comienzo.

Comportamiento de las exportaciones del subsector cerámico y/o alfarero: Colombia exportó en el año 2000 aproximadamente 18 millones de dólares en artesanías. Según las estadísticas sobresalen con buena participación y crecimiento los subsectores tradicionales, como la cerámica, las estatuillas en madera y otros subsectores que incursionan con elevado crecimiento, como la bisutería, los productos de origen animal o vegetal y las manufacturas de vidrio. Esta situación asegura un reconocimiento de estos productos colombianos en los mercados internacionales, ya que son percibidos como productos “hechos a mano”, de excelente calidad (Proexport, 2003).

Del total de exportaciones colombianas de artesanías, las exportaciones del subsector cerámico tienen una

participación del 50,6%. En 1998, fueron US \$8´576 millones de dólares, en 1999 fueron US \$8´690 millones y en el año 2000 tuvieron un valor de US \$9´475, señalando un crecimiento sostenido entre 1998 y 2000. El principal destino de las exportaciones de artesanías colombianas en el año 2002 fue Estados Unidos, con US \$5´300.000,00 aproximadamente, seguido por Venezuela con US \$2´900.000,00 y la Unión Europea US \$1´900.000,00. Sin embargo, es importante resaltar la cantidad y valor de artesanías que tienen como destino las zonas francas del país, especialmente Cartagena (Ministerio de Comercio Industria y Turismo, 2002).

Dentro de los sectores de promoción de Proexport para exportación, la cerámica ocupa el renglón más importante con un aumento significativo año a año, tal como se observa en el Cuadro 5.

Uno de los factores que los artesanos y específicamente el subsector cerámico debe tener en cuenta para poder seguir aumentando su participación dentro de las exportaciones de Colombia es el aseguramiento de la calidad con normas internacionales. Esto se considera una urgente necesidad para las micro, pequeñas y medianas empresas.

Cuadro 5. Exportaciones colombianas del subsector cerámico por posición arancelaria.

POSICIÓN ARANCELARIA	DESCRIPCIÓN	FOB (US\$) 1999	FOB (US\$) 2000	FOB (US\$) 2001	PARTICIP. (%) 2001	FOB (US\$) 2002
<u>691200000</u>	VAJILLA Y DEMÁS ARTÍCULOS DE USO DOMÉSTICO, HIGIENE O TOCADOR EXCEPTO DE PORCELANA	5,429,848	7,412,600	7,157,607	76.51	9,637,076
<u>691390000</u>	LAS DEMÁS ESTATUILLAS Y DEMÁS ARTÍCULOS PARA ADORNO, DE CERÁMICA	1,054,154	960,353	1,120,506	11.98	1,015,301
<u>691490000</u>	LAS DEMÁS DE DEMÁS MANUFACTURAS, DE CERÁMICA	758,118	477,194	508,097	5.43	517,090
<u>691110000</u>	ARTÍCULOS PARA EL SERVICIO DE MESA O COCINA, DE PORCELANA	1,370,565	362,940	449,358	4.80	780,163
<u>691310000</u>	ESTATUILLAS Y DEMÁS OBJETOS DE ADORNO, DE PORCELANA	3,007	95,356	95,204	1.02	111,275
<u>691190000</u>	LOS DEMÁS, VAJILLAS Y DEMÁS ARTÍCULOS DE USO DOMÉSTICO, HIGIENE O TOCADOR, DE PORCELANA	6,439	102,248	19,628	0.21	79,972
<u>701310000</u>	ARTÍCULOS DE VITROCERÁMICA	66,917	31,709	4,541	0.05	70
<u>691410000</u>	LAS DEMÁS MANUFACTURAS, DE PORCELANA	169	39,516	40	-	73,579
TOTAL		8,689,217	9,481,916	9,354,981	100	12,214,526

Fuente: Proexport

CONCLUSIONES

La caracterización y el análisis del subsector reveló que no se practica la asesoría continua y progresiva para los artesanos, aunque sí han recibido ayudas técnicas en cuanto a capacitación, desde hace algunos años, por parte de entidades del Estado. En la zona rural, la actividad artesanal constituye la mayor fuente de ingresos y este oficio ha experimentado, en los últimos años, un aumento en el porcentaje de empleo generado, especialmente en la elaboración de cerámica. Existe una gran zona de influencia de producción artesanal que puede ser fácilmente aprovechada, destacándose por la diversificación de los productos.

La presencia de los comerciantes mayoristas, teóricamente favorece al artesano por el impulso que le da la comercialización en la zona, pero en la práctica, actúan solamente resguardando sus intereses. Esto implica que el artesano se siente desamparado ante las formas de trabajo aplicadas por los comerciantes mayoristas.

La comercialización de los productos artesanales, se facilita debido a la presencia de comerciantes-intermediarios y al desplazamiento de algunos artesanos a participar en ferias y la presencia de algunos almacenes ubicados en la comunidad. Sin embargo, el problema mayor es la ausencia de precios de sustentación, ya que los dueños de almacenes y comerciantes intermediarios los determinan para su bien, perjudicando a las artesanas que tienen un bajo nivel de producción. Finalmente, por influencia negativa de este gremio existe una tendencia a disminuir la calidad de los productos, básicamente por la orientación dada a algunos de ellos, en la que interviene activamente el comerciante mayorista, quien es portador de los requerimientos del mercado.

Se destaca la necesidad de recursos monetarios enfocados hacia diferentes aspectos, que faciliten la realización de las actividades artesanales. La poca capacitación de los artesanos en temas administrativos y económicos, así como su desconfianza en los programas de fomento, le impide atreverse a tomar créditos y aprovechar las alternativas propuestas por entidades financieras. Los artesanos no cuentan con los conocimientos suficientes para controlar sus actividades, por lo que son pocos los que llevan un control sobre la producción.

Existe una fuerte desconfianza y recelo por parte de los artesanos hacia las formas de trabajo asociativo o de organización y se observa una gran dificultad en lo que respecta a la mano de obra ocupada, principalmente por la falta de continuidad de los participantes en el proceso de producción, resaltando, por lo tanto, la participación de mano de obra en mayor porcentaje familiar que no familiar y con incidencia en la mayor cantidad de mujeres. Los ingresos que obtienen por esta actividad les ayuda a subsistir, no siendo considerada como la única fuente de ingresos, sino complementaria al aporte que hace el hombre para el sostenimiento de la familia.

Crece la analogía “Hecho a mano” es “Hecho con calidad”, es decir, que los productos artesanales tienen un valor significativo en lo cultural, lo antropológico, lo sociológico y no solamente representa un valor económico para los consumidores de otros países. En un mundo globalizado, los consumidores de otros países aprecian nuestras artesanías, es decir, que hay un mercado potencial a nivel internacional que no está siendo aprovechado por los artesanos de los municipios de Ráquira y La Chamba.

RECOMENDACIONES

Realizar cursos de capacitación en aspectos relacionados con la producción, así como estudiar formas de apoyo al artesano, no consideradas por los comerciantes mayoristas, para mejorar la oportunidad de la comercialización de sus productos e implementar sistemas de crédito que le permitan tener mayor nivel de producción.

Desarrollar programas motivacionales para demostrar cuan importante es la actividad artesanal y crear estrategias de comercialización internacional de los productos artesanales, a través de nuevos sistemas de producción, teniendo en cuenta diseños originales y nuevas tecnologías que permitan ingresar y mantenerse dentro de los mercados internacionales.

Intensificar los programas de fomento que se desarrollan en la actualidad, con el objeto de inducir y motivar a la juventud en la práctica de las actividades artesanales y otorgar capacitación a los artesanos en temas administrativos y organizacionales que les ayude a establecer mecanismos de funcionamiento y a mantener un constante interés en su desarrollo y evaluación.

Desarrollar un modelo que combine el proceso de producción y de comercialización a escala, para poder construir un modelo de comercialización internacional que permita aumentar la oferta exportable de productos cerámicos y/o alfareros, con un alto impacto en la generación de empleo y la consecución de divisas, con el fin de mejorar el nivel de vida de los artesanos del subsector en Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

- ARTESANÍAS DE COLOMBIA. 1999. Guía para exportar artesanías e identificación del oficio para la determinación de origen en Colombia. Bogotá: Ministerio de Desarrollo Económico, 185p.
- BENAVIDES, E.O. 1997. Comportamiento de las exportaciones de las Artesanías Colombianas, 1972 - 1992. Santafé de Bogotá, Artesanías de Colombia S.A. 280p.
- DELGADO, T.C. 2001. Empaques para exportación de artesanías, del municipio de Guacamayas. Santafé de Bogotá: Universidad de los Andes, 250p.
- ESTAGE, N.C. 1998. Artesanías mexicanas frente a la internacionalización. Revista Oaxaca 20:15.
- FONSECA SARAVIA, J.M. 1985. Estudio de factibilidad de una empresa productora y comercializadora de artesanías para exportación. Santafé de Bogotá: Universidad de los Andes. 287p.
- MINISTERIO DE DESARROLLO ECONÓMICO. 1998 a. Gestión institucional artesanías de Colombia 1990-1998: una huella en el desarrollo artesanal. Santafé de Bogotá: Artesanías de Colombia, p.61.
- MINISTERIO DE COMERCIO, INDUSTRIA Y TURISMO. 2002. Estadísticas. p.30.
- NAVARRO G., P. 2001. Soportes y accesorios para artesanías de la Chamba a partir de material reciclado y biodegradable, Bogotá: Universidad de los Andes. p180.
- PROEXPORT. 2003. Análisis del comportamiento de las exportaciones colombianas 1999 - 2002. p16.
- RODRÍGUEZ G., M. 2001. Creación de nuevas empresa: artesanías colombianas para exportación a Canadá. Bogotá: Universidad de los Andes, 257p.
- ROJAS E., G. 1984. Diagnóstico de las necesidades del sector artesanal la Chamba, (Tolima) Santafé de Bogotá: Artesanías de Colombia, p.42.
- SOTO P., C.C. 1989. Carpeta oficio artesanal, la Chamba, Tolima. Santafé de Bogotá á: Artesanías de Colombia, 1989. Dactilografiado, 158p.
- URRUTIA, M. 1971. El sector artesanal en el desarrollo colombiano. Bogotá: Universidad Nacional. 178p.
- VILLAREAL I., P. 2000. Centro de acopio de artesanías para exportación. Santa Fe de Bogotá: Universidad de los Andes, 350p.

Recibido: Julio 19 de 2006

Aceptado: Febrero 28 de 2007

¿INCENTIVAN Y PROMUEVEN LOS ESTUDIOS DE POSTGRADO LA INVESTIGACIÓN Y LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL?

DO POSTGRADUATE STUDIES INCENTIVE AND PROMOTE RESEARCH AND INTELLECTUAL PRODUCTION?

Ingeborg Zenner de Polanía ¹
María Teresa Ríos Tovar ²

RESUMEN

Para analizar si en para Colombia se cumple la regla establecida por los países desarrollados que los postgrados, las maestrías y específicamente los doctorados obtenidos en cualquier disciplina facultan a los profesionales para realizar investigaciones y lógicamente hacer asequibles los resultados a otros científicos, a nivel nacional e internacional, se analizaron y se compararon los antecedentes disponibles de los líderes de grupos de investigación, correspondientes a cuatro de los once programas nacionales de Ciencia y Tecnología reconocidos y establecidos por el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología - COLCIENCIAS hasta el año 2006. Se logró comprobar, de manera contundente que, o la mayoría de los docentes en la educación superior o investigadores de centros especializados no investigan o si lo hacen, no difunden, de manera apropiada, los nuevos conocimientos o tecnologías obtenidos. El género femenino muestra, proporcionalmente, una mayor producción intelectual, a pesar de que sigue en desventaja en cuanto al postgrado, en comparación con el masculino. La divulgación de los

resultados a través de revistas indexadas, nacionales e internacionales, aunque ocupa un porcentaje importante del total es equitativamente similar a los artículos publicados en revistas no indexadas. Finalmente llama la atención el hecho de la mayor producción de las universidades privadas en comparación con las oficiales, a pesar de disponer estas últimas de un número mayor de docentes, líderes de grupos de investigación reconocidos, con títulos de postgrado.

Palabras clave: postgraduados, investigación, visibilidad, género.

SUMMARY

To analyze, if in Colombia the rule, coined by developed countries, that postgraduate education, masters or specially doctorates obtained within any discipline, empowers professionals to realize research and logically make available the results to other scientists at national and international levels, the available antecedents of the leaders of research groups, corresponding to four of the eleven national programs of Science and Technology, recognized and established by Colciencias up to 2006, were analyzed and compared. It was successfully proven that, either the mayor part of university professors or researchers within specialized centers do not investigate or if they do so, the new knowledge or

¹ I.A., M.Sc., Ph.D. Docente Investigadora, Programa de Ingeniería Agronómica, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A izenner@udca.edu.co

² Estadística, Coordinadora Área Estadística, Departamento de Planeación, U.D.C.A marrios@udca.edu.co

technologies obtained is not diffused appropriately. The female gender shows proportionally a higher intellectual production, even so women continue in disadvantage with regard to postgraduate education compared with men. Result publication within national or international indexed journals, although occupy an important percentage of the total, is equitably similar to articles published in non-indexed serials. Finally attention was attracted by the fact of the mayor production of private universities in comparison with the official ones, in spite of having the public universities at its disposal a higher number of professors, leaders of research groups, with postgraduate titles.

Key words: postgraduates, research, visibility, gender.

INTRODUCCIÓN

Colombia se ha propuesto pertenecer a la “Sociedad del Saber”, la cual se relaciona íntimamente con la “Sociedad de la Información”, denominación que recibe la primera década del siglo actual (Zenner de Polanía, 2004). Para alcanzar estos propósitos, se debe disponer de talento humano, capacitado para la transformación de la realidad contemporánea con sus investigaciones, es decir, contar con profesionales, con postgrados, quienes por su educación y su experiencia específica han sido capacitados para afrontar el reto y llevar a cabo la tarea de aumentar los conocimientos en ciencia y en tecnología. Al respecto, Cárdenas (1999) afirma que entre los atributos de la sociedad del saber está la necesidad de preparar más profesionales para realizar estas actividades. Agrega la UNESCO (1999), durante la conferencia mundial sobre ciencia cuyo lema era “la ciencia en el siglo XXI: un nuevo compromiso”, que el futuro dependerá cada vez más de una producción equitativa del conocimiento, lo que implica, ente otros retos, la capacidad científica y la participación de la mujer en la ciencia y la tecnología de los países en vía de desarrollo. Agrega Valenti López (2002), quien habla de la “Sociedad del Conocimiento o de la Economía del Conocimiento”, que para cumplir con la formación de esta sociedad, las instituciones de los países en vías de desarrollo deben comprender las “determinantes de este fenómeno y poder identificar los mecanismos y variables a considerar en una estrategia hacia la construcción”. Entre estos mecanismos, se encuentra la educación avanzada.

Uno de los doctorados en Ciencias Políticas y Sociales de mayor prestigio en el ámbito de habla española, indica que “el doctorado busca analizar con recursos teóricos y metodológicos renovados las transformaciones de la realidad contemporánea, por lo que se inserta en el variado panorama de modificaciones que las ciencias sociales experimentan en las más importantes universidades del mundo” (UNAM, México, 2006). Menciona y recalca, además, el desarrollo de una investigación original desde el inicio del estudio, relacionada con la formación académica previa del aspirante.

Conscientes de la necesidad de la formación avanzada de los integrantes de las comunidades académicas y de los centros de investigación, tanto públicos como privados, se ofrecen diversas oportunidades de postgrados en Colombia y en el exterior, a través de becas manejadas por el Instituto Colombiano de Crédito Educativo y Estudios Técnicos en el Exterior (ICETEX) y COLCIENCIAS. Así, de acuerdo con Lucio (2003), el número de profesionales dedicados a la investigación en los establecimientos de educación superior, oficiales y privados, e igualmente de investigadores con “productos certificados” (artículos en revistas indexadas, libros, patentes), ha aumentado en más de un 50%, entre el año 1998 y 2000. Se destaca, de acuerdo al mismo autor, un incremento sustancial de 213 a 1 138 investigadores con productos certificados en las Universidades Oficiales Nacionales, mientras que en las Universidades no Oficiales, de 379 investigadores con productos, en el año 1998; solamente se llegó a 448, en el año 2000. Indica el mismo autor que, en las universidades oficiales nacionales, el 34% de los docentes ostenta el título de maestría y el 8% el de doctor, mientras que en las universidades no oficiales estos porcentajes corresponden al 20% y 3%, respectivamente, para el año 2000.

Una investigación original forma parte de los postgrados, tanto que la mayoría de las Universidades de la Unión Europea enfatiza en este quehacer académico. Como requisito para la obtención del título de doctor, se exige la publicación de artículos científicos en revistas seriadas indexadas.

Picardo (2002), citado por Rodríguez (2004) enfatiza que las sociedades del conocimiento deben ilustrar al público, por lo tanto, la relevancia que reviste el hacer visible los resultados es indiscutible. Mostrar a otros investigadores y al público en general los conoci-

tos logrados, es, por lo tanto, una obligación para los integrantes de los diversos grupos de investigación del país. Difícil es, sin embargo, llegar al público en general, ya que los medios de comunicación nacionales, como lo expresa Lisbeth Fog, no se interesan por publicar resultados de investigaciones obtenidos en el país, prefieren noticias llegadas del exterior (Mendoza, 2007). Acerca de la “apropiación social de la ciencia en la competitividad para Colombia”, Solano-Franco (2005) hace un interesante análisis recalcando la ausencia de una política de divulgación, requerida para que Colombia se convierta en una sociedad del saber. El periodismo científico es una necesidad apremiante en el país.

Los profesionales, con postgrado, o no investigan o no publican, o no actualizan sus hojas de vida, lo cual, se observa con frecuencia al buscar árbitros de artículos sometidos a revistas indexadas. Hoy día, la “evaluación por pares” es una obligación y le corresponde al editor, junto con el Comité Editorial, establecer el banco de árbitros competentes (ICFES, 2003). Los pares deben cumplir requisitos para que la revista sea tenida en cuenta “para la clasificación de revistas en las categorías del índice bibliográfico nacional Publindex”. Entre los requisitos, se destaca que los árbitros “deben haber publicado, en los dos años anteriores al período de observación (de la revista), al menos un artículo de los tres tipos, investigación, revisión o reflexión” (COLCIENCIAS, 2005). Al revisar en busca de árbitros las hojas de vida de los pares y de los líderes de grupos de investigación, disponibles en la página web de Colciencias, se tiene la impresión de que un título de maestría o de doctorado no faculta aparentemente para una mayor producción intelectual. Con la presente investigación, se pretendió precisamente aclarar y documentar estas hipótesis y, además, contestar las siguientes preguntas: ¿Dónde están los profesionales con postgrado en el sector privado o en el oficial de la educación superior?, ¿existe diferencia en la producción, traducida en artículos científicos publicados, entre hombres y mujeres?, ¿cuál de los géneros aprovecha más el postgrado?, ¿las universidades que se distinguen por su productividad están localizadas en el distrito capital o en la “provincia”? y, finalmente ¿dónde se publica más: en revistas indexadas o no indexadas?

El Observatorio Colombiano de Ciencia y Tecnología (OCyT) (2005) ya contestó algunas de estas preguntas en forma parcial, pero con un enfoque diferente, lo cual será base para el análisis de los resultados obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el análisis de los indicadores bibliométricos, se escogieron las hojas de vida de los líderes de los grupos de investigación reconocidos por COLCIENCIAS, de cuatro de los once programas nacionales de Ciencia y Tecnología. Se evaluaron un total de 373 hojas de vida, 93 de líderes de los grupos del Programa Nacional de Ciencias y Tecnologías Agropecuarias, 159 de aquellos de Ciencias del Medio Ambiente y 45 y 116, respectivamente, de los Programas de Biotecnología y Estudios Científicos de la Educación (COLCIENCIAS, 2006a; 2006b; 2006c; 2006d; 2006e; 2006f). Los datos tomados fueron: la institución a que pertenece el profesional, si es pública o privada, centro de investigación, público o privado, o equivalente, el género del investigador, el máximo nivel de escolaridad y el número de publicaciones por género, tanto en revistas indexadas (COLCIENCIAS, 2005), como en no indexadas. Además, los grupos de cada programa nacional, se catalogaron en sectores. Para las ciencias y tecnologías agropecuarias, en sector agrícola y pecuaria; para ciencias del medio ambiente y hábitat, en ingenierías, biología-ecología y ecosistemas; para biotecnología en vegetal, animal y ambiental y para estudios científicos de la educación, en pedagogía, educación en ciencias y currículo. Los datos, se agruparon en tablas, para analizarlos con estadísticas descriptivas, y comparando entre sí los cuatro programas de CyT.

Para establecer la significancia estadística, se sometieron a pruebas de hipótesis, la totalidad de los datos:

$H_0 : p_1 \geq p_2$ donde p_1 es la proporción de hombres que publican en revistas indexadas, p_2 es la proporción de mujeres que publican en revistas indexadas, versus

$H_0 : p_1 \leq p_2$. La prueba efectuada fue:

$$Z = \frac{(\hat{p}_1 - \hat{p}_2) - (p_1 - p_2)}{\sqrt{\frac{\hat{p}_1(1 - \hat{p}_1)}{n_1} + \frac{\hat{p}_2(1 - \hat{p}_2)}{n_2}}}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las tablas 1, 2, 3 y 4, donde se consignaron los datos obtenidos, se observa que el programa con el menor número de grupos de investigación corresponde

a Biotecnología (BT) (Tabla 2), seguido por el de Ciencias y Tecnologías Agropecuarias (CyTA) (Tabla 1). En comparación con los datos del OCyT (2005), se nota una disminución de grupos, de 53 a 45 en BT y de 119 a 93 en CyTA. Esto puede haber tenido la influencia negativa detectada al discutir el TLC con Estados Unidos, en el sentido de la falta de competitividad del sector. Ambos programas enfatizan sus estudios en los reinos animal y vegetal y en las perspectivas relacionadas con la biodiversidad, es decir, con lo ambiental y los sectores agrícola y vegetal. En ambos sectores sobresale la Universidad Nacional de Colombia (UN), sedes Bogotá y Medellín, seguido por las Universidades privadas, de La Salle y la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. En cuanto al programa de BT, se manifiesta una ligera superioridad de la Universidad de Antioquia. En BT, la participación de la mujer, como líder de grupo, es del 48,8%, mientras que en CyTA solamente alcanza un 20,4%. Olaya (2003), quien analizó la participación de la mujer en la investigación, menciona que para el año 2000, un 20% de los grupos inscritos en COLCIENCIAS eran lideradas por mujeres, y el OCyT (2005) calcula un 20,9%; en cinco años, el panorama no ha cambiado. Con relación a las publicaciones en revistas indexadas, en BT, se destaca definitivamente la mujer. Un 68,5% del total de las publicaciones tiene como autor principal a una mujer, mientras que en CyTA, aunque mejora un poco sobre el porcentaje de líderes de grupos, solo alcanza el 22,9%. Si se analiza la proporción entre mujeres y hombres con educación avanzada y su producción intelectual en BT, se obtiene una proporción de 1,85:0,73. A pesar de un número considerablemente menor de mujeres con postgrados, su producción es más del doble de la de los hombres. En CyTA esta proporción corresponde a 1,06:1,10, lo cual demuestra que la mujer ha avanzado y conquistado espacios de investigación, que de acuerdo a Olaya (2003), prácticamente habían sido reservados para los hombres.

De las tablas 1 y 2, se deduce también que una mayor actividad investigadora, se realiza en las universidades públicas. Un 18,18% del total de instituciones involucradas del sector agropecuario corresponde a centros de investigación, dentro de los cuales se destaca CENICAFÉ. Aunque le sigue en importancia CORPOICA, se considera preocupante que esta corporación, con sedes en todo el país, dedicada de manera exclusiva a la investigación científica y tecnológica para hacer com-

petitivo el sector, solamente muestra, en forma oficial, cinco grupos de investigación. Además, no se detectan artículos publicados en revistas indexadas. Igualmente llama la atención que, gremios tan importantes como los floricultores, agrupados en ASOCOFLORES, los arroceros y los palmeros, pertenecientes a FEDEARROZ y a CENIPALMA, no ostentan grupos reconocidos por COLCIENCIAS. Este aspecto se podría mejorar considerablemente al fortalecer la relación Universidad – Sector Productivo.

Un panorama diferente, se detecta en BT. Un 30,76% de las instituciones dedicadas a la investigación, no corresponde a universidades y dentro de las 18 universidades, seis pertenecen a establecimientos privados. Se destacan la Universidad de Los Andes (U. Andes) y la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ). La premisa de la publicación de un artículo en una revista indexada en dos años, sí se cumple en BT; mientras que en el programa agropecuario, este número ni siquiera alcanza un artículo. La proporción de publicaciones calculada entre la universidad privada y la oficial favorece en ambos programas a las privadas. En BT, la proporción es de 0,88:0,85, mientras que en CyTA corresponde a 3,00:2,36. En general existe una mayor publicación en revistas no indexadas.

Los grupos pertenecientes a Universidades localizadas en Bogotá insinúan una mayor productividad en el sector agropecuario, que aquellas situadas en las capitales de departamentos; la excepción es la U. de Antioquia. Con relación a la BT, las Universidades de “provincia”, se destacan sobre las de la capital, con la excepción de la PUJ. Este último resultado, se podría deber a lo ya detectado por Lucio (2003), quien menciona que la inversión en CyT es mayor en las Universidades oficiales departamentales que en las oficiales nacionales, lo cual favorecería al programa de BT, cuyas investigaciones requieren inversiones elevadas, tanto en infraestructura como en equipos.

En la tabla 3, se encuentran los resultados del programa de Ciencias del Medio Ambiente y Hábitat (CMAH). Nuevamente, se nota una disminución en el número de grupos, de 187 reconocidos en el año 2005 (OCyT, 2005) quedaron solo 159, en el 2006. Los grupos, se dividieron en Ingenierías, Biología y Ecología y Ecosistemas; aquellos dedicados a Ingenierías ocupan el mayor

Tabla 1. Programa Nacional de Ciencias y Tecnologías Agropecuarias. Producción intelectual con relación al género y el último título académico obtenido*.

INSTITUCIÓN	GRUPOS/SECTOR		GÉNERO		POSTGRADO**				PUBL. EN REVISTAS 2004 – 2005***		
	Agríc.	Pec.	♂	♀	M.Sc.		Dr.		Index.	No index.	
					♂	♀	♂	♀	♂	♀	
U.N. BOGOTÁ**	11	9	17	3	4	3	12		18	1	2
U.N. MEDELLIN	4	1	5				5		4		
U.N. PALMIRA	2	1	3		1		2		5		
U.N. MANIZALES	1		1				1				
U. DE NARIÑO	1	1	2		1		1		2		
U. DEL CAUCA	3	1	2	2	1	2	1				
U. DEL QUINDÍO	1		1				1		2		
U. DEL VALLE	1		1				1				
U. DE FRANCISCO DE P. SANTANDER	1			1		1					
U.P.T.C TUNJA**	3	1	4		2		1		6		
U. DE ANTIOQUIA	1	3	1	3		1	1	2	3	6	2
U. DE CALDAS	1	3	4		1		3				1
U. DE LA SALLE	1	5	3	3	3	2	1		3	3	4
U. DE CORDOBA	1	1	2		1		1		5		1
U.D.C.A** **	2	3	2	3	1	1		1	5	2	1
U. T. DEL CHOCÓ**	2		1	1				1		1	4
UIS	1			1			1				2
CORP. UNIV. SANTA ROSA DE CABAL**	1		1								4
U. J. TADEO LOZANO	2		2				2		5		
U. POPULAR DEL CESAR**	1		1								1
CORP. UNIV. DE SANTANDER	1		1								
U. DE CARTAGENA	1		1		1						1
UNISUR	1		1				1				
U. DEL TOLIMA	1		1				1				
U. SANTO TOMÁS	1		1		1						
U. DEL MAGDALENA	2		2		1		1				1
CENTRO INV. DEL BANANO AUGURA	2		2		2						1
CENICAFÉ	5	1	6		1		4		16		2
CORPOICA	1	4	4	1		1	4				1
CONIF**	1		1								
CENICAÑA	1		1				1				
SINCHI	1			1				1		4	
TOTAL	59	34	74	19	21	11	46	5	74	17	28

* Resumen de datos tomados de la hoja de vida de los líderes de los 93 grupos de investigación reconocidos por COLCIENCIAS (enero de 2006).

** Diez líderes sin postgrado.

*** Se incluyeron artículos aceptados para publicación.

Tabla 2. Programa Nacional Biotecnología. Producción intelectual con relación al género y el último título académico obtenido*.

INSTITUCIÓN	GRUPOS/SECTOR			GÉNERO		POSTGRADO**				PUBL. EN REVISTAS		
	Veg.	Anim.	Amb.	♂	♀	M.Sc.	Dr.	Index.	No index.	♂	♀	
U.N. BOGOTÁ	2	1	1	2	2		1	2	1	1	1	1
U.N. MEDELLIN	1	2	2	2	3	1	2	1	1	1	5	
U. DEL CAUCA	1			1		1						3
U. DEL VALLE		1		1				1		1		1
U.P.T.C TUNJA			1		1				1		1	
U. DE ANTIOQUIA	2	3	1	2	4	1	1	1	3	2	2	1
U. DE LA SALLE	1	1	1	2	1	1		1	1	1		2
U. T. DEL CHOCÓ	1			1				1				
UIS		1		1				1		1		
U. DEL MAGDALENA	1	1		1	1	1			1		5	
U. DE LOS ANDES			2		2		1		1			
PONT. U. JAVERIANA	2		1	2	1	1		1	1	5		1
U. PONT. BOLIVARIANA			1		1				1			4
U. CATOL. ORIENTE	1			1				1				
U. TECN. PEREIRA	1				1				1		1	
U. MIL. N. GRANADA	1				1				1			
U. CAT. MANIZALES	1			1				1		1		
U. M. BELTRÁN		1		1		1						
CIB	1	1		2				2		4		
CORPOICA			1		1				1		19	
CORP. BIOTEC	1			1				1				
FUND. TROILOGÍA**		1		1								
CORPOGEN **		1			1						3	
CENTRO INTERNAL FÍSICA	1				1			1				
ICA	1			1				1				3
POLICÍA NAL. JUDICIAL		1			1	1						
TOTAL	19	15	11	23	22	8	6	15	14	17	37	16

* Resumen de datos tomados de la hoja de vida de los líderes de los 45 grupos de investigación reconocidos por COLCIENCIAS (enero de 2006).

** Diez líderes sin postgrado.

*** Se incluyeron artículos aceptados para publicación.

porcentaje, 39,62%, lo cual se refleja también en la producción intelectual por género. Solamente, un 29,7% de los artículos publicados en revistas indexadas tiene como autores a mujeres. Sin embargo, la proporción calculada de artículos durante dos años entre mujeres y hombres con título de postgrado, muestra una ligera ventaja del género femenino, 0,83 sobre 0,80. En este programa que representa a los grupos dedicados a los aspectos ecológicos, biológicos y a los ecosistemas, se suponía una mayor participación de la mujer, lo cual todavía no se vislumbra, solo un 28,30% de los grupos es liderado por el género femenino.

La proporción de la producción entre los investigadores de las Universidades públicas, privadas y las instituciones o centros de investigación, corresponde a 2,75:2,2:0,53. Se destaca la Universidad pública, tanto de la capital, como de la provincia, sobresaliendo nuevamente la U. de Antioquia, seguida por la U.N. sede Bogotá y sede Medellín, la U. del Valle y la U. Industrial de Santander (UIS). En cuanto a las universidades privadas, se destaca la U. Andes, seguida por la PUJ. Finalmente, sobresale en forma negativa, que los líderes de los 159 grupos solamente son coautores de un total de 121 artículos, no alcanzando la meta de un artículo por dos años. Sin

Tabla 3. Programa Nacional de Ciencias del Medio Ambiente y Hábitat. Producción intelectual con relación al género y el último título académico obtenido*.

INSTITUCIÓN	GRUPOS/SECTOR			GÉNERO		POSGRADO**				PUBL. EN REVISTAS 2004-2005***		
	Ing.	Biol. Ecosist.	Ecol.	♂	♀	M.Sc.		Ph.D		Index.		No index.
						♂	♀	♂	♀	♂	♀	
U.N. BOGOTÁ	5	7	3	13	2	6	2	7		14		1
U.N. MEDELLÍN	2	1	5	4	4		2	4	2	7	2	1
U.N. PALMIRA			1	1				1				
U.N. MANIZALES	1		3	3	1	1		2	1	2		
U.N. LETICIA		1		1		1				5		
EAFIT**	3			3		2				5		4
U. DEL CAUCA		5		3	2	2	1	1	1			2
U. DEL QUINDÍO		1		1		1						
U. DEL VALLE	7	1	3	7	4	2		5	4	1	7	2
U. DE FRANCISCO DE P. SANTANDER	1				1				1			
U.P.T.C TUNJA	1	2	1	3	1	1	1	2		1		1
U. DE ANTIOQUIA	4	3	1	3	5	1		2	5	3	19	1
U. DE CALDAS			1	1				1				2
U.D.C.A **		1			1						2	
U. TÉC. DEL CHOCÓ **	1	5		4	2	3	2			2		2
UIS	2			1	1			1	1	1	5	
Fund. U. J. TADEO LOZANO		2			2		2					
U. DEL BOSQUE	1			1				1				
U. DE CARTAGENA	1			1				1		4		
UNISUR		1		1				1				1
U. DEL TOLIMA			1	1				1				
U. SANTO TOMÁS	1		1	2		2						1
U. DEL MAGDALENA	2	1	2	4	1	2	1	2		1		1
ESC. COL. ING. JULIO. GARAVITO	5			5		4		1		5		2
U. DE LOS ANDES	3		5	8		4		4		10		1
PONT. U. JAVERIANA	4	1	4	4	5	1	1	3	4	4	3	1
U. AUTÓNOMA DEL OCCIDENTE		1			1				1			3
FUNDACIÓN UNIV. DEL NORTE **	3			3		1		1		3		1
U. DIST. F.J. CALDAS	1	1	1	3		3				2		
U. TECN. DE PEREIRA	2		2	4		1		3		4		
U. ANTONIO NARIÑO	1		1	1	1		1	1				1
U. DEL ATLÁNTICO	1		1	1	1	1			1			
U. PILOTO DE COL. **			2	2		1						
U. MIL.N. GRANADA	1		1		2		1		1		1	
U DE BOYACÁ ** **	2		1	2	1	1				1		1
U. PONTIF. BOLIV.	2			1	1	1	1					
ESC. ING. ANTIOQU.	1			1		1				1		1
U. DE MEDELLÍN	1				1				1		2	
U. SANTIAGO CALI		1		1		1						2
U. DE SUCRE		1		1		1						
U. DE MANIZALES	1			1		1				1		3
PONT. U. JAV. CALI			1	1				1		1		
U. EXTERN. DE COL.			1	1				1		2		
CIPAV**			1	1								

Tabla 3. (Continuación)

INSTITUCIÓN	GRUPOS/SECTOR			GÉNERO		POSGRADO**				PUBL. EN REVISTAS 2004-2005***		
	Ing.	Biol. Ecosist	Ecol.	♂	♀	M.Sc.		Ph.D		Index.		No index.
						♂	♀	♂	♀	♂	♀	
INGEOMINAS			3	2	1	1		1	1			
J & G ASOCIADOS	1			1				1		2		
INST. NAL. SALUD			1		1				1			
INST. TECN. METROP. MEDELLÍN	1			1				1				3
SINCHI **		1	3	4		2		1		2		
FUND. NATURA COL.			1		1		1					
CORPOICA			1	1				1				
INST. INVEST. PRESERV. PATRIM.		1		1				1				
CORP.C.I. CARBONO & BOSQUES MED.**		1		1								
INVEVAR			1	1				1				
CENICAFÉ		1		1				1		1		2
FUND.ARAGUATOS**		1		1						1		
U. DE PAMPLONA	1				1		1					
INST. ALEXANDER VON HUMBOLDT		1			1				1		2	1
CORP. OBSERVAT. DEL CARIBE			1	1		1						
TOTAL	63	42	54	114	45	49	17	56	26	85	36	41

* Resumen de datos tomados de la hoja de vida de los líderes de los 159 grupos de investigación reconocidos por COLCIENCIAS (enero de 2006).

** Once líderes sin postgrado.

*** Se incluyeron artículos aceptados para publicación.

embargo, al incluir los artículos publicados en revistas no indexadas, si se lograra por lo menos un artículo en dos años, lo cual sigue siendo una pobre producción.

Al comparar estos datos con aquellos del análisis bibliométrico durante cinco años sobre la actividad investigativa en Biodiversidad (Biosíntesis, 2001), se observa una aparente disminución de la producción de los investigadores en este campo. El total de artículos, en el periodo comprendido entre 1995 y 1999, fue de 1084 en revistas nacionales e internacionales, indexadas o no, mientras que en dos años, incluyendo los tres sectores en los cuales se dividió el Programa Nacional de CMAH, el cual incluye la Biodiversidad, solamente se detectaron 162 artículos.

El último programa, el de Estudios Científicos de la Educación (ECE) (Tabla 4), muestra un panorama desolador. Los líderes de los 116 grupos de investigación, 38 menos que en el año 2005 (OCyT, 2005), quienes se

ocupan de los sectores de la pedagogía, de la educación en ciencias y de los aspectos curriculares, nueve sin postgrado, 51 con título de maestría y 56 con doctorado, durante los últimos dos años solamente publicaron 40 escritos en revistas indexadas. Sumando lo publicado en revistas indexadas y no, la producción corresponde a medio artículo por año. El Programa de ECE es el único de CyT en el cual el número de mujeres con doctorado sobrepasa el de los hombres, lo cual ya fue detectado por Tovar (2002). Sin embargo, solamente un 35% de los resultados visibles de las investigaciones es fruto del género femenino.

En este programa sobresalen los productos de las Universidades públicas, encabezado por la U. Pedagógica Nacional, seguido por la U. Distrital Francisco José de Caldas y las Universidades del Atlántico y de Antioquia. Las Universidades privadas, aunque muestran una participación por grupos del 24,13%, solamente ostentan el 12,5% del total de publicaciones, destacándose

Tabla 4. Programa Nacional de Estudios Científicos de la Educación. Producción intelectual con relación al género y el último título académico obtenido*.

INSTITUCIÓN	GRUPOS/SECTOR Pedag. Educac. Curr. en Cienc.			GÉNERO		POSGRADO**				PUBL. EN REVISTAS 2004 - 2005***		
				♂	♀	M.Sc.		Dr.		Index.		No index.
				♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
U.N. BOGOTÁ**	1	2		3		1		1		1		
U.N. ABIERTA Y A DISTANCIA	1			1				1		1		
U.N. MANIZALES **		1	1	2		1						
U. DE NARIÑO			1		1		1					
U. DEL CAUCA **	2	1	1	1	3			1	2		2	4
U. DEL VALLE	2	5		4	3	3		1	3			1
U. FRANCISCO DE P. SANTANDER **	1			1								
U.P.T.C TUNJA	1			1				1		1		1
U. DE ANTIOQUIA	8	3	2	6	7		3	4	6	4		4
U. DE CALDAS		2	1	2	1			2	1	1		1
U. T. DEL CHOCÓ	1				1				1			1
UIS	1	1			2				2			
U. DE CARTAGENA	1				1				1		1	2
UNISUR			2	2		1		1				1
U. SANTO TOMÁS	1	1		2				2				4
U. DEL MAGDALENA **	1		2	1	2	1	1			2		4
ESC. COL. ING. JULIO GARAVITO		1		1		1						
U. DE LOS ANDES	1	2		2	1	1		1	1	2		
PONT. U. JAVERIANA **	1	2		3		1						
FUND. U. DEL NORTE	1	1		1	1			1	1			1
U.DIST. F. J. CALDAS **	6	5		2	9		4	1	5	2	5	4
U.T. DE PEREIRA **	2		1	1	2				2	1	1	
U. ANTONIO NARIÑO	1				1				1			
U. DEL ATLÁNTICO	6		1	4	3	2	1	2	2	4		3
U. PEDAG. NAL.	4	5	2	4	7	2	5	2	2	3	5	3
U. MIL. N. GRANADA		1			1				1			2
U DE LA SALLE	1			1		1				1		3
U. PONTIV. BOLIV.	1				1				1			
U. CAT. ORIENTE	1			1				1				
U. AUTÓNOMA MANIZALES			1	1				1		1		
U. CENTRAL	1			1		1						
U. COOP. DE COLOMBIA (Bogotá)	1				1				1			
U. DE PAMPLONA		1			1		1					1
U. DE LA SABANA	1			1				1		1		
U. DE S. BUENAVENT.	1				1		1					
U. LIBRE COL. (Cali)	1			1		1						1
ESC. PEDAG. EXPERIMENTAL	1	2		3		3						
COOP. UNIV. SINU	1				1		1					
U. EXTERN. DE COL.			1		1		1					

Tabla 4. (Continuación)

INSTITUCIÓN	GRUPOS/SECTOR Pedag. Educac. Curr. en Cienc.			GÉNERO		POSGRADO**				PUBL. EN REVISTAS 2004 - 2005***		
				♂	♀	M.Sc.		Dr.		Index.		No index.
					♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
CORP. UNIVERSITARIA MINUTO DE DIÓS	1			1		1						
U. COOP. DE COLOMBIA (Barancabermeja)	1				1		1					1
CORP. SOC. COL. DE PEDAGOGÍA	1			1		1						
CORP. EDUC. MAYOR DEL DESARROLLO S. BOLIVAR	1	2		2	1	1		1	1			18
FUND. REVISTA. EDUC. CIENCIAS		1		1				1		1		
FUND. CAMINOS DE ENTIDAD	1			1		1						
INST. NAL. SALUD	1			1		1						1
ASCUN	1				1		1					1
CENTRO DE INVEST. Y DES. ACADÉMICO		1			1				1			1
TOTAL	60	40	16	60	56	25	21	26	35	26	14	63

* Resumen de datos tomados de la hoja de vida de los líderes de los 159 grupos de investigación reconocidos por COLCIENCIAS (enero de 2006).

** Once líderes sin postgrado.

*** Se incluyeron artículos aceptados para publicación.

nuevamente la U. Andes y mostrando su participación la U. de La Sabana. No se detectó diferencia significativa entre las Universidades con sede en el Distrito Capital y en la Provincia. La ausencia de la visibilidad de los resultados, se puede considerar alarmante en este sector, que abarca no solamente la educación superior sino todos los niveles educacionales que conducen a ella. Murcia (2004) atribuye en parte la aparente carencia de investigación educativa a la deficiencia educacional de metodologías de investigación en el pregrado y la falta de incentivos. Igualmente, menciona la autora, la falta de personal especializado en investigación para el año 2000, lo cual, basado en el elevado número de grupos actualmente reconocidos por COLCIENCIAS, ya pierde vigencia. Rodríguez (2004), analizando los “problemas que afectan el desarrollo del conocimiento”, sugiere una reorientación de la investigación en educación.

Rosselli-Cock (2005), al buscar las causas de la reducida publicación científica colombiana, menciona el poco énfasis “en la redacción” en las instituciones de educación superior, en comparación con las universidades anglosajonas. Analizando el plan de estudios de diversos programas de maestría y doctorado en el país,

efectivamente éstos carecen de asignaturas que “enseñan a escribir”. ¿Será que el miedo al ver un artículo rechazado, impide una mayor producción intelectual de los investigadores colombianos?

Las pruebas de hipótesis comprobaron lo indicado anteriormente. Para los líderes de los grupos agropecuarios, se rechaza la H_0 , a un nivel de significancia del 10%, es decir, si existe diferencia en publicaciones en revistas indexadas y los hombres no publican más que las mujeres. Para el Programa CMAH, la prueba proporciona $-3,968$. La hipótesis nula es también rechazada y se acepta la alternativa: el género masculino no publica más que el femenino. Para el tercer programa, la BT, el Z obtenido $-0,64$ hace que aceptamos la hipótesis nula: es decir, proporcionalmente los hombres muestran una mayor visibilidad de sus investigaciones. Los líderes de los grupos del Programa ECE, con $Z = 2,05$, muestran nuevamente la superioridad proporcional por parte de las mujeres.

Para el integrado de los anteriores programas, la prueba proporciona $2,08$, lo cual implica, en forma global, el rechazo de la hipótesis nula, es decir, los hombres no

publican más que mujeres. Este hallazgo final de una mayor productividad de las mujeres, líderes de grupos se puede deber, en general, a la mayor dedicación de este género. Probablemente, avanzar en el mundo competitivo de CyT y escalar posiciones, ha sido difícil y, una vez alcanzado, ellas quieren demostrar que merecen estas distinciones.

Al organizar las instituciones en públicas y privadas y proponer la misma hipótesis, se obtiene que, para el caso del sector público, la Z nos da: 6,374 y para el sector privado: -1,58. Del 100% de los grupos analizados, en el sector privado, el 11,11% es liderado por hombres y 20,29% por mujeres, y en el sector público el 36,47% y el 32,13%, respectivamente. La participación de la mujer en grupos y centros de investigación, en los dos sectores, representó de acuerdo a Olaya (2003) un 40%; lo cual, para los programas analizados, muestra un avance en la participación de la mujer en CyT.

Referente al título académico, maestría o doctorado, el 36,71% de los líderes pertenece al sector privado y el 63,29%, al sector público; el 12,66% son hombres del sector privado y el 28,48% del público, mientras que el 24,05% de las mujeres son del sector privado y el 34,81% del público. Respecto al doctorado éstos corresponden al 23,42% del sector privado y al 75,58% del público, el 9% de los hombres son del privado y el 45,5% del público y las mujeres son 14,41% del sector privado y el 31,08% del sector público. Al hacer referencia a las publicaciones en revistas indexadas, el 24,6% es producido por investigadores de entidades privadas y el 75,4% por profesionales de entidades públicas. El género femenino solamente representa alrededor del 50% en todas las categorías mostradas en la figura 1, lo cual indica, sin embargo, un aumento del porcentaje de mujeres con postgrados, en relación con lo detectado por Tovar (2002), el 42,6%.

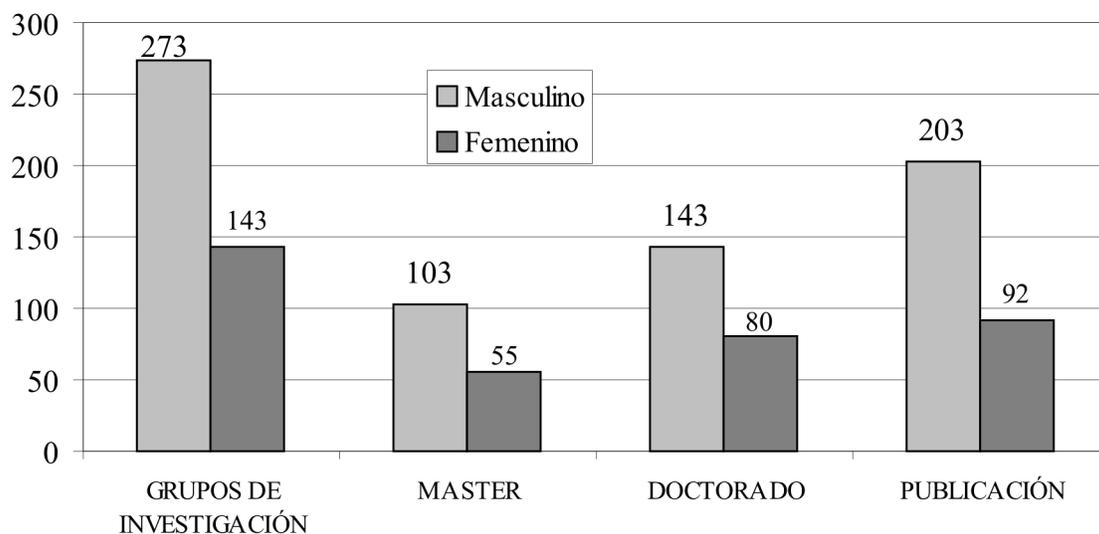


Figura 1: Análisis comparativo del comportamiento del género del líder del grupo de investigación, su grado académico y su producción intelectual.

Para todos los grupos de investigación inscritos para enero del año 2005, OCyT calculó 2,19 líderes hombres por cada líder mujer. En este estudio, enero 2006, para los cuatro programas la relación correspondió a

1,96:1, lo cual se podría interpretar como un avance en la participación del género femenino como directrices de grupos. Al realizar la misma comparación para postgrados, el OCyT muestra 2,77 hombres doctores por

cada mujer con este título, mientras que para los cuatro programas analizados esta relación es más favorable al género femenino, mostrando una proporción de 1,78 doctores hombres por cada mujer con este título.

Con estos resultados preliminares del avance de la mujer en los diversos campos de la ciencia, se vislumbra un futuro más prometedor para el género, lo cual concuerda, en general, con lo expuesto por González & Pérez (2002), quienes afirman que ya existe una integración, por lo menos parcial, de las mujeres a campos previamente vedados. Además, resaltan que este aspecto “implica un claro compromiso con la transformación de la educación, la práctica y la gestión de la ciencia y tecnología”.

Los resultados indican que, en general y a pesar de la supremacía del sector público en cuanto a la existencia de grupos de investigación reconocidos, este sector no sobresale proporcionalmente en productividad intelectual. La inversión en investigación, traducido en infraestructura y postgrados, se debería reflejar en una mayor visibilidad de resultados. Es probable que en la universidad pública muchos docentes buscan un postgrado, ante todo, para fines de avanzar en el escalafón. Además, se puede concluir que:

- Los postgrados no incentivaron a los tenedores de los títulos, maestría o doctorado para una mayor producción y divulgación de conocimientos.
- Un título aparentemente tiene como meta principal el avance en el escalafón, establecido por el Decreto 1279 del 2002 para los docentes de las Universidades Estatales y no la búsqueda de nuevos conocimientos a través de la investigación. Este “avance” es igualmente válido para las Universidades privadas y centros o instituciones oficiales o privadas.
- El género femenino muestra proporcionalmente una mayor producción intelectual, a pesar de que todavía esta relativamente renegado en cuanto a títulos de postgrado obtenidos.
- En la mayoría de los cuatro programas de ciencia y tecnología examinadas existe proporcionalmente una mayor difusión de los resultados de investigación procedente de las universidades privadas.
- No se debe descartar la posibilidad de que los líderes de los grupos de investigación no actualizan las hojas de vida, lo cual tendría como resultado una apreciación errónea de la producción del conocimiento.
- La investigación en los establecimientos de educación superior merece un replanteamiento tanto a nivel interno, como a nivel nacional.

BIBLIOGRAFÍA

- BIOSÍNTESIS. 2001. Actividad investigativa en biodiversidad de Colombia: análisis bibliométrico 1995–1999. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Boletín 27. 4p.
- CÁRDENAS, F.A. 1999. Doctorados y Sociedades de Conocimiento. Seminario Internacional: la docencia en la universidad contemporánea. Ascun-Icetex-Secab. Cali, Agosto 12 y 13.
- COLCIENCIAS. 2006a. Directorio de Grupos Colombianos de Investigación Científica y Técnica e Innovación. Programa Nacional de Ciencia y Tecnologías Agropecuarias. Disponible desde Internet en: <http://pamplonita.colciencias.gov.co:8081/scienti/html/grupos.html> (con acceso 14-18/11/05 y 16-20/01/06).
- COLCIENCIAS. 2006b. Currículo CvLAC. Programa Nacional de Ciencia y Tecnologías Agropecuarias. Disponible desde Internet en: <http://pamplonita.colciencias.gov.co:8081/scienti/html/curriculums.html> (con acceso 14-18/11/05 y 16-20/01/06).
- COLCIENCIAS. 2006c. Directorio de Grupos Colombianos de Investigación Científica y Técnica e Innovación. Programa Nacional de Ciencias del Medio Ambiente y Hábitat. Disponible desde Internet en: <http://pamplonita.colciencias.gov.co:8081/scienti/html/grupos.html> (con acceso 14-18/11/05 y 16-20/01/06).
- COLCIENCIAS. 2006d. Currículo CvLAC. Programa Nacional de Ciencias del Medio Ambiente y Hábitat. Disponible desde Internet en: <http://pamplonita.colciencias.gov.co:8081/scienti/html/grupos.html>

- colciencias.gov.co:8081/scienti/html/curriculum.html (con acceso 14-18/11/05 y 16-20/01/06).
- COLCIENCIAS. 2006e. Directorio de Grupos Colombianos de Investigación Científica y Técnica e Innovación. Programa Estudios Científicos de la Educación. Disponible desde Internet en: <http://pamplonita.colciencias.gov.co:8081/scienti/html/grupos.html> (con acceso 26/01/06-03/02/06).
- COLCIENCIAS. 2006f. Directorio de Grupos Colombianos de Investigación Científica y Técnica e Innovación. Programa Estudios Científicos de la Educación. Disponible desde Internet en: <http://pamplonita.colciencias.gov.co:8081/scienti/html/curriculum.html> (con acceso 26/01/06-03/02/06).
- COLCIENCIAS. 2005. Índice Bibliográfico Nacional–Publindex. Disponible desde Internet en: www.colciencias.gov.co (con acceso 16/11/05).
- GONZÁLEZ G., M.I.; PÉREZ S., E. 2002. Ciencia, tecnología y género. *Rev. Iberoam. Ciencia, Tecn., Soc. Innov.* 2, Enero-Abril 2002. Disponible desde Internet en: <http://www.oei.es/revistactsi/numero2/valenti.htm> (con acceso 04/03/07).
- ICFES. 2003. La búsqueda de la visibilidad a través de la calidad: reto del editor. Serie Calidad de la Educación Superior No. 9. Bogotá. 145p.
- LUCIO, J. 2003. Ciencia y Tecnología en la Universidad Colombiana. Observatorio Colombiano de Ciencia y Tecnología. Bogotá. 65p.
- MENDOZA, C.I. 2007. ¿El periodismo se olvidó de la ciencia nacional?. *El Tiempo*, Sección Información General. Columna de la Defensora. Domingo 4 de 2007. p.24
- MURCIA L., D.I. 2004. Investigación educativa. *Vestigium* 1(1): 54-59.
- OBSERVATORIO COLOMBIANO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (OCyT). 2005. Indicadores de ciencia y tecnología, Colombia 2005. 298p.
- OLAYA M., D.L. 2003. La creciente participación de la mujer en la investigación. *Colombia: Ciencia y Tecnología* 21(1):16-25.
- PRESIDENCIA DE LA REPÚBLICA. 2002. Decreto 1279 de Junio 19 de 2002. 30p.
- RODRÍGUEZ R., E.A. 2004. Las sociedades del conocimiento y el futuro de la educación en Colombia. *Vestigium* 1(2):18-23.
- ROSSELLI-COCK, D.A. 2005. Enseñar a escribir. *Innovación y Ciencia. (A.C.A.C. Colombia)*. 12(3):16-17.
- SOLANO-FRANCO, V. 2005. Ver para creer....y divulgar para creer. *Innovación y Ciencia. (A.C.A.C. Colombia)*. 12(1,2):93-97.
- TOVAR ROJAS, P. 2002. Género y Ciencia en Colombia: algunos indicadores. *Colombia: Ciencia y Tecnología*. 20(2):16-25.
- UNAM, MÉXICO. 2006. Doctorado en Ciencias Políticas y Sociales. Disponible desde Internet en: <http://www.crim.unam.mx/docencia/Docotrado.htm> (con acceso 15/01/06).
- UNESCO. 1999. Conferencia mundial sobre la ciencia “La ciencia en el siglo XXI: un nuevo compromiso”. Resúmenes. Budapest, 26 de Junio–1 de Julio 1999.
- VALENTI LÓPEZ, P. 2002. La sociedad de la información en América Latina y el Caribe: TICs y un nuevo marco institucional. *Rev. Iberoam. Cienc., Tecn. Soc. Innov.* 2, Abril 2002. Disponible desde Internet en: <http://www.oei.es/revistactsi/numero2/valenti.htm> (con acceso 04/03/07).
- ZENNER DE POLANÍA, I. 2004. El que tiene el saber, tiene el poder. Carta Universitaria. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Agosto. p.3.

Recibido: Noviembre 11 de 2006

Aceptado: Marzo 16 de 2007

DIFICULTADES EN EL APRENDIZAJE DE MATEMÁTICAS

DIFICULTIES IN MATHEMATIC LEARNING

Eliseo Ramírez Rincón ¹

RESUMEN

El artículo corresponde a un avance de la investigación “Comprensión de lenguaje matemático por parte de estudiantes de primer semestre de Ingeniería Agronómica de la U.D.C.A al resolver problemas de matemáticas de variación”. Aborda y analiza las dificultades que tuvo un grupo de estudiantes en la clase de matemáticas al realizar un ejercicio sobre una función y sus representaciones.

Palabras clave: Lenguaje, matemáticas, dificultades, función, problemas.

SUMMARY

This article corresponds to an advance of the research “Comprehension of the mathematical language by students of the first term of U.D.C.A's Agricultural Engineering when solving variation math problems”. Tackles and analyzes the difficulties that one group of students had in the mathematics class when realizing an exercise of the function and its representations.

Key words: Language, mathematics, difficulties, function, problems.

INTRODUCCIÓN

D'Amore (2006) indica que son muchos los autores que afirman que la “matemática es por sí misma un lenguaje”. Es evidente esta consideración porque en efecto en las matemáticas hay sintaxis, semántica y pragmática. Las tres se relacionan y no puede haber una sin la existencia de la otra y son éstas las que dan sentido a los objetos de conocimiento matemático, significados y significantes. La comprensión de la sintaxis, la semántica y la pragmática en la enseñanza-aprendizaje de las matemáticas es un proceso lento y, por demás, muy difícil de abordar.

Tanto la enseñanza como el aprendizaje son procesos muy complejos en los que intervienen diferentes actores en un marco cultural y social con la finalidad de poner en discusión: costumbres, valores, problemas, preguntas, conceptos, saberes disciplinares y saberes propios de cada cultura, entre personas que tienen intereses comunes. Estas acciones están mediadas por la comunicación generada a través de los lenguajes (común, de las ciencias, de las matemáticas, del aula, tecnológico,...), de las diversas formas de interacción de las personas y de la ayuda de otras ciencias, como la pedagogía, la didáctica, la tecnología y demás disciplinas que buscan hacer más favorable el tránsito en estos procesos.

El conocimiento de las matemáticas, en general, al ser complejo es multidireccional y, por ende, no se puede reducir ni tampoco linealizar. Los saberes que emanan de éstas y que circulan en la sociedad moderna son prioritariamente de tres formas: el saber disciplinar (matemático), el saber escolar (institucional) y el saber del aula (profesor- estudiante).

Según Godino (2007), el lenguaje como conformador y producto resultante de las mentes individuales ha sido

¹ M.Sc. en docencia de las matemáticas. Estudiante de doctorado. Profesor investigador en Matemática Educativa U.D.C.A elramirez@udca.edu.co; elmatematis@gmail.com (dirección para correspondencia)

y sigue siendo objeto de estudio desde Wittgenstein, Vygotsky hasta el interaccionismo simbólico. La investigación sobre el lenguaje está mostrando que éste tiene una marcada influencia en el proceso de enseñanza-aprendizaje de las matemáticas y que, por lo tanto, es en educación uno de los aspectos a los que se les debe prestar especial interés.

El proyecto sobre “Comprensión del lenguaje matemático”, surge por una parte como resultado del proyecto “Errores que cometen los estudiantes de primer semestre de ingenierías de la U.D.C.A, al resolver problemas de matemáticas” (Ramírez, 2006). En el trabajo sobre errores entre otros, se encontró, por ejemplo, que para un mismo objeto de conocimiento matemático los estudiantes no encontraban ninguna relación entre la simbología matemática, el lenguaje común de ellos, los libros y el lenguaje del profesor. Hecho preocupante y de especial interés, porque por una parte los estudiantes consideran que la simbología de las matemáticas es muy difícil y “enredada” para ellos, lo que aparentemente el profesor comunica no es lo que los estudiantes están entendiendo y al recurrir a los textos de consulta la comprensión tampoco es fácil para ellos.

Por otra parte, el creciente interés en el tema mostrado por los grupos de investigación en Educación Matemática como, por ejemplo, PME (Psicología de la Educación Matemática), DME (Didáctica de la Matemática Educativa), quienes consideran que el Lenguaje debe ser un mediador en la comunicación de conocimientos matemáticos y no una dificultad más que deben sortear los estudiantes para aprender matemáticas en el colegio o en la universidad. Lo anterior ha servido de antecedente investigativo para iniciar el proyecto de investigación “Comprensión del Lenguaje Matemático por parte de estudiantes de primer semestre de ingeniería Agronómica de la U.D.C.A”. Este artículo presenta un avance del trabajo sobre “Comprensión del Lenguaje Matemático” correspondiente a la tercera fase del proyecto, en la que se propuso estudiar el trabajo individual de los estudiantes en la clase de matemáticas sobre la forma como ellos pasan la información dada en un contexto determinado de un lenguaje a otro (natural o matemático).

Se analiza un ejercicio trabajado con los estudiantes, correspondiente a una función y sus representaciones. La función propuesta fue trabajada por 28 jóvenes de primer semestre de Ingeniería Agronómica de la U.D.C.A,

en el segundo semestre de 2006, en dos de las clases regulares, de dos horas cada una. El objetivo pretendía que ellos percibieran las representaciones (tabular, gráfica y algebraica) de la función como equivalentes semánticas de ésta. Sin embargo, respecto a la misma función, las dificultades manifestadas correspondieron al hecho de que ellos entendieron que la representación gráfica obtenida con el programa Graphic 4.1 (Johansen, 2005) era una “verdad” incuestionable y que en cambio las representaciones tabular y algebraica podían estar equivocadas. Llo anterior puede significar, por una parte, que la percepción gráfica es muy potente para ellos y es vista como el mismo objeto matemático en cuestión; al respecto Duval (1999) afirma que para que haya comprensión de un concepto matemático es necesario diferenciar el objeto matemático de sus representaciones.

De otra parte, la comprensión que sobre las representaciones de la función tienen los estudiantes está muy ligada a la concepción que tienen del infinito, visto éste como un conjunto acabado (infinito actual), en el que los sucesos que se perciben (en la representación gráfica) constituyen la misma función, ignorando las otras representaciones como parte del análisis de la misma función, es decir, confunden el objeto con una de sus representaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ejercicio, se propuso inicialmente para que los estudiantes hallaran el dominio, el rango y determinaran la continuidad de la función. El ejercicio, se convirtió en un problema para todos los estudiantes, porque se dividieron las opiniones respecto a la continuidad de la función en $x=0$. Al principio para todos era evidente dicha discontinuidad y algunos decían que era una discontinuidad asintótica y otros conjeturaron que era removible. En esta discusión, se fueron las dos primeras horas de trabajo de clase y, por lo tanto, se hizo necesario retomar la situación en la siguiente clase. En esta segunda sesión, se utilizó el programa Graphic 4.1 (Johansen, 2005), como ayuda visual y la primera impresión de la gráfica obtenida les causó confusión en los estudiantes en el sentido que esta representación no mostraba en detalle la discontinuidad, sino que por el contrario la gráfica daba la impresión que la función era continua en $x=0$, por supuesto concluyeron que estaban

equivocados junto con el profesor al decir que había una discontinuidad en $x=0$. A partir de este hecho surgió la idea de este trabajo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el proceso que han seguido los estudiantes a lo largo de su vida académica en cuanto al aprendizaje de las matemáticas es evidente la influencia tanto de lo local (colegio, comunidad, profesores, compañeros...) como de lo global (políticas educativas, cultura, sociedad, institución matemática...) y, por lo tanto, la enseñanza y el aprendizaje de las matemáticas dependen de algunos aspectos fundamentales, como los enmarcados en las siguientes preguntas.

¿Qué visiones de las matemáticas tenemos y transmitimos los profesores de matemáticas?

Para responder a esta pregunta es necesario revisar también la visión que tienen los profesores de matemáticas y de ciencias (particularmente en las naturales por su alto contenido matemático como en física) sobre educación científico (por lo menos en occidente) y sobre educación matemática; desde el punto de vista del desarrollo de pensamiento científico, que permita a cualquier ciudadano poder razonar y comprender aspectos fundamentales de las situaciones que le son cotidianas o que de alguna manera inciden en sus diario vivir, como por ejemplo: el calentamiento global, el agua como recurso no renovable, el uso de pesticidas, la inflación, el T.L.C., entre otras razones porque las dos disciplinas representan una necesidad del desarrollo social y personal de los individuos y además ambas han estado ligadas en los procesos históricos y epistemológicos del desarrollo humano.

Las expectativas puestas en la contribución de las ciencias a personas que están en sociedades modernas, Gil-Pérez & Vilches (2001), no se han cumplido y en cambio han promovido un fracaso generalizado. Lo que es peor han generado un creciente rechazo de los estudiantes hacia el aprendizaje de las ciencias y, por ende, también de las matemáticas. Esto, porque la visión de ciencia que ha prevalecido es muy matematizable y la visión que se ha transmitido de las matemáticas es como un producto acabado y no como una construcción social, en la que los acuerdos de la construcción de los objetos matemáticos corresponde a la comunidad de matemá-

ticos y la educación matemática debe ser oficio de los profesores de matemáticas, formados para educar a los jóvenes en los principios, los procesos, las habilidades y las competencias de las matemáticas que les permitan resolver problemas en diversos contextos (matemáticas, de otras ciencias y cotidianos). Lo anterior ha repercutido para que los estudiantes se alejen de las ciencias y de las matemáticas, porque las consideran como de seres especiales o de "locos", aspectos que no corresponden a la realidad de la comunidad de científicos destacados en la historia, como Leibnitz, Newton, Galileo, Einstein, Gauss, Riemann, porque como seres humanos tuvieron dificultades propias de los humanos y sus trabajos correspondieron entre otros a logros obtenidos por muchos otros investigadores, inclusive de épocas distintas.

Algunos estudiosos del problema de la enseñanza de las ciencias, como Furio & Vilches (1997), han mostrado que hay graves distorsiones de la naturaleza de la ciencia que justifican, en gran medida, tanto el fracaso de buen número de estudiantes como su rechazo de la ciencia. Hasta el punto de que hayamos comprendido, como afirman Guilbert & Meloche (citados en Gil-Pérez & Vilches, 2004), que la mejora de la educación científica exige, entre los requisitos ineludibles, modificar la imagen de la naturaleza de la ciencia que los profesores tenemos y transmitimos. El anterior análisis incluye también a la enseñanza de las matemáticas, porque son evidentes las distorsiones de la naturaleza de éstas en la medida en que no se ubican los objetos matemáticos en la historia, se desconocen los problemas que en su momento se pretendían resolver con las matemáticas de esa época, no se establecen relaciones de los alcances que en matemáticas tuvieron algunas culturas (en la historia de la humanidad), las dificultades que padecieron en esta empresa y las diferencias con la actual matemática, no solo desde el rigor si no desde lo epistemológico, la didáctica y su lenguaje.

Estas distorsiones han sido favorecidas y propagadas con ayuda no sólo de lo institucional, sino desde los mismos individuos que de alguna manera pertenecen a esta gran comunidad.

Las investigaciones coinciden en mostrar que la mayoría de los docentes y los estudiantes de matemáticas y de ciencias naturales comparten la creencia de que las matemáticas y el saber científico son "verdaderos". Objetos de conocimiento, conceptos, leyes y teorías... son constitutivos del mundo abstracto y real, en los que

matemáticos y científicos se limitan a “descubrirlos”. El supuesto básico es: *existe un mundo real que es cognoscible mediante la razón humana*.

En las ciencias naturales, por ejemplo, “Fuerza, inercia, gravedad no son construcciones mentales sino entidades realmente existentes que revelan una estructura causal del mundo y permiten una explicación mediante estos mecanismos causales” (Rodríguez, 1998). En matemáticas, en cambio, los objetos son construcciones mentales que responden a una lógica y se ubican en el marco de una cultura que los avala y son demostrables a través de la deducción y el rigor de las matemáticas, por lo tanto, hay que recordar que dichos objetos no existen en la realidad y que este hecho los convierte ya en una dificultad, porque se puede confundir los objetos con sus representaciones. En este sentido, las investigaciones cognitivas están interesadas en estos procesos relacionados con el aprendizaje de los objetos de conocimiento matemático, donde es fundamental tener en cuenta que la forma en que se aprende no suele coincidir con la manera lógico formal de presentar un objeto matemático ante la comunidad matemática; se puede inclusive afirmar que es frecuente que dicha presentación lógica ofrezca obstáculos cognitivos al estudiante (didácticos, psicológicos o epistemológicos). Las didácticas de las ciencias y las matemáticas no necesariamente deben responder al desarrollo histórico y epistemológico de las disciplinas, sin embargo tampoco se las debe desconocer y por ello los profesores deben tener un excelente nivel en lo disciplinar y un excelente nivel en la didáctica de la disciplina.

Desde la didáctica de las matemáticas un hecho importante lo constituye el trabajo realizado por el grupo de trabajo del ICME 7 (celebrado en Québec, en el año 1992) denominado “Las dificultades de los estudiantes en el Cálculo”, que contó con un amplio número de participantes de diferentes países, con el objetivo de responder a algunas cuestiones agrupadas en tres aspectos principales Artigue & Ervynck (1993).

- Objetivos y contenidos: ¿Cuáles son los objetivos de un curso de cálculo?, ¿cuál es el papel del cálculo en el currículo de las matemáticas?, ¿cuáles son las relaciones entre los aspectos conceptuales y los aspectos técnicos de los contenidos del curso?
- Dificultades de enseñanza y aprendizaje: ¿Cuáles son las dificultades comunes a todos los aspectos del

cálculo?, ¿cuáles son las dificultades específicas de algunos aspectos?, ¿cuáles son las razones de tales dificultades?

- Concepciones del cálculo y su enseñanza que subyacen en las distintas experiencias: ¿Qué problemas surgen a la hora de implementar secuencias de enseñanza?, ¿cuáles han sido los resultados?, ¿están de acuerdo los resultados obtenidos con los resultados esperados?, ¿es posible explicar las divergencias entre los resultados esperados y los conseguidos?

Muchas de estas preguntas han quedado abiertas y constituyen las preguntas más generales de investigación. Distintos autores han venido señalando un conjunto de dificultades en la enseñanza y en el aprendizaje de los objetos de Análisis Matemático. Se consideran como dificultades esenciales el concepto de límite y los procesos infinitos que intervienen en los conceptos básicos de derivada e integral; se indican además, otro tipo de dificultades que tienen que ver con el estudio de las funciones, la notación de Leibnitz, el concepto de infinito, el uso y selección de las distintas representaciones y el lenguaje de las matemáticas (Ramírez, 2006; Garbin & Azcarate, 2000).

En muchas reformas curriculares, las calculadoras graficadoras y simbólicas y los Programas de Cálculo Simbólico (PCS4) juegan un papel importante. En Estados Unidos, se desarrolla desde 1986 el proyecto C2PC (Calculator and Computer). En Colombia, se ha venido implementando la cultura desde los estándares curriculares como política nacional, inclusive dotando a los colegios de computadores y software especializado, pero eso no es suficiente, porque desde la complejidad de la educación habría que implementar también cambios en la administración del currículo para descentralizar las salas de sistemas y de informática en el sentido que éstas sean laboratorios de trabajo de las ciencias, como la física, la biología, la química y las matemáticas, inclusive las ciencias sociales, por ejemplo, en los modelos económicos se podría ayudar con el ambiente de las salas de informática. Otro hecho a tener en cuenta es la actualización de los profesores en paquetes educativos que faciliten el aprendizaje a través de la simulación, la graficación y la solución de algoritmos.

En matemáticas y en ciencias ¿los profesores tienen una visión acumulativa, de crecimiento lineal?

Una deformación a la que tampoco suelen hacer referencia los equipos docentes y que es la segunda menos mencionada en la literatura tras la visión exclusivamente analítica, consiste en presentar el desarrollo científico como fruto de un crecimiento lineal, puramente acumulativo (Izquierdo, Sanmarti & Espinet, (1999) citados en Gil-Pérez & Vilches (2001). Igualmente en matemáticas en la que prima la axiomatización a partir del pensamiento aristotélico. En ambas visiones, se han ignorando las crisis y las remodelaciones profundas, fruto de procesos complejos que no se dejan ahorrar por ningún modelo definido de desarrollo. Esta deformación es complementaria, en cierto modo, de lo que se ha denominado visión rígida, algorítmica, aunque deben ser diferenciadas: mientras la visión rígida o algorítmica se refiere a cómo se concibe *la realización de una investigación dada*, la visión acumulativa es una interpretación simplificada de *la evolución de los conocimientos: matemáticos y científicos, a través de la historia, como fruto de la complejidad de investigaciones* realizadas en determinado campo. Una visión simplificada a la que la enseñanza suele contribuir al presentar las teorías y los conceptos hoy aceptadas(os) sin mostrar el proceso de su establecimiento, ni referirse a las frecuentes confrontaciones entre teorías rivales, ni a los complejos procesos de cambio, que incluyen auténticas “revoluciones científicas” (Kuhn, 1970).

Las anteriores preguntas intentan abrir un espacio a la reflexión sobre el hecho que los estudiantes cuando llegan a la universidad, traen consigo unas ideas propias de la ciencia y de las matemáticas y que muchas de ellas tienen el arraigo de las creencias (como acto de fe) que han sido generadas en el ambiente escolar previo, en

las raíces culturales, en la sociedad y en la disciplina de cada área del conocimiento.

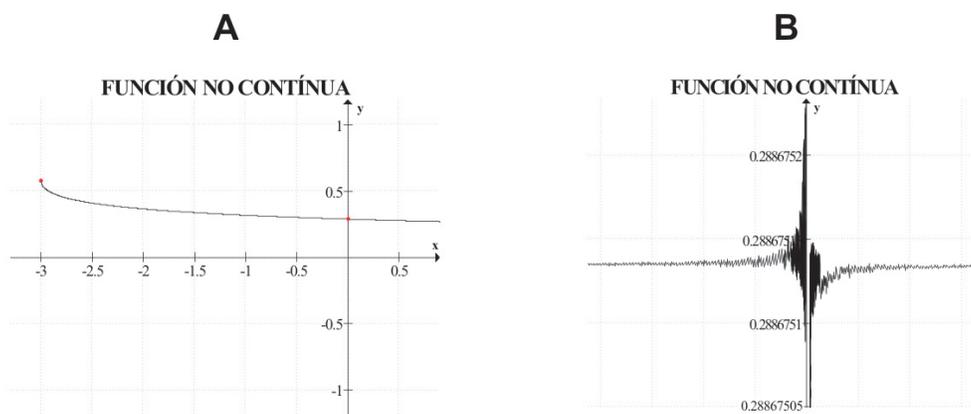
El siguiente es el ejemplo desarrollado con los estudiantes y con él se pretende mostrar la dificultad que se genera en la comprensión del paso entre las representaciones de la función: gráfica, tabular, algebraica y en lenguaje natural, porque es usual que en el colegio se inicie a los estudiantes en el concepto de función privilegiando una de sus representaciones descuidando las otras. Entre las familias de funciones sucede algo parecido, se favorece a las funciones de naturaleza algebraica y se descuidan las trigonométricas, la exponencial y la logarítmica. El ejercicio propuesto corresponde a la familia de funciones que mejor conocen ellos, la algebraica.

El ejemplo escogido, se recrea en tres de las representaciones de la función, (algebraica, tabular y gráfica), con el fin de mostrar que para los estudiantes en este nivel es usual que consideren a cada representación de la misma función como representaciones de distintas funciones también.

Representación algebraica

$$f(x) = \frac{\sqrt{(x+3)} - \sqrt{3}}{x}$$

En las gráficas 1, A y B de la misma función, se muestran dos registros distintos de la gráfica de la función f . La representación de la gráfica 1A, muestra la función f , como si fuese continua en $x=0$, y la de la gráfica 1B,



Gráfica 1. Se muestran dos gráficas de la función f . La representación de la A, muestra la función como si fuese continua y la de la B, presenta una discontinuidad en $x = 0$.

presenta una discontinuidad en $x=0$, que es el objeto de estudio de este artículo porque en el grupo mencionado se presentó gran dificultad en la comprensión de la función y de sus representaciones.

La tabla 1 corresponde a valores asignados a la función f . Dichos valores están en el intervalo cerrado $[-0,5; 0,5]$ en décimas. En esta representación, se presenta la función f , en un intervalo restringido. Esta tabla no proporciona

valores de la función ni de sus derivadas en $x=0$, porque la función no existe allí (no existir una función significa que, para un valor asignado a X , su correspondiente $f(x)$, no tiene valor numérico). La tabla 2 de valores para la función está dada en milésimas en un intervalo cerrado $[-0,001, 0,001]$. En esta representación, se restringe aún más el intervalo, con el fin de percibir algún cambio en la función en las cercanías de $x=0$, sin embargo en este intervalo no se percibe.

Tabla 1. Intervalo en décimas de la función; no existe para $x = 0$, que es decreciente en $[-5,0) \cup (0,5]$ y cóncava hacia arriba.

x	f(x)	f'(x)	f''(x)
-0,5	0,3018	-0,0288	0,0113
-0,4	0,2990	-0,0277	0,0105
-0,3	0,2963	-0,0267	0,0098
-0,2	0,2937	-0,0258	0,0091
-0,1	0,2911	-0,0249	0,0085
0			
0,1	0,2863	-0,0233	0,0075
0,2	0,2840	-0,0225	0,0071
0,3	0,2818	-0,0219	0,0067
0,4	0,2796	-0,0212	0,0063
0,5	0,2776	-0,0206	0,0060

Tabla 2. Intervalo de la función en milésimas; no existe en $x=0$, y se observa además que cuando x , se acerca a cero por izquierda y por derecha la función tiende a estabilizarse en un único valor.

x	f(x)	f'(x)	f''(x)
-0,001	0,2887	-0,0241	0,0080
0			
0,001	0,2887	-0,0240	0,0080

En la tabla 3, los valores asignados a la función f están en cienmilésimas en un intervalo cerrado $[-0,00001, 0,00001]$. Se restringe aún más el intervalo y se percibe que la función se estabiliza en un valor constante $f(x)$

(en la tabla 3, no se escribieron todos los valores). Es decir, que si x tiende al valor cero la función se acerca a 0,2887 tanto por la izquierda de cero como por la derecha del mismo.

Tabla 3. Intervalos en cienmilésimas; si x tiende al valor cero la función se acerca a 0,2887 tanto por la izquierda de cero como por la derecha del mismo valor ($x=0$).

x	$f(x)$	$f'(x)$	$f''(x)$
-0,00001	0,2887	-0,0241	0,0081
0			
0,00001	0,2887	-0,0241	0,0080

De aquí en adelante el programa con el que estábamos evaluando la función desde su representación gráfica (Graphic 4.1) no aceptó intervalos más pequeños porque su capacidad de redondeo probablemente está dada en cienmilésimas y cantidades más pequeñas las asume como cero.

El inconveniente con esta representación radicó en que la mayoría de los estudiantes no comprendieron el significado de que en la tabla no aparecía ningún valor para $f(x)$ cuando $x=0$, y más aún cuando al restringir el intervalo (cienmilésimas) aparecía en la tabla $f(x)=0$, para $x=0$. Esto produjo en ellos una gran confusión. En esta experiencia, los estudiantes confiaron completamente en la gráfica (gráfica 1, que fue la primera que ellos lograron hacer), la consideraron única y cuestionaron el hecho de “¿por qué si la gráfica muestra una función continua en $x=0$, el profesor dice que no lo es?”. Fue evidente que la representación gráfica generó en ellos confianza y no se atrevieron a compararla con la información dada en las tablas ni mucho menos con la información que se podía hallar del análisis a la representación algebraica.

En general, en problemas de este tipo el análisis de la representación algebraica fue el que menos se tuvo en cuenta por parte de los estudiantes por su complejidad. En una de las dos clases, se hizo con ellos el análisis algebraico y a través de éste se pudo ver que la función no existe para valores de “ X ” menores a menos tres [en lenguaje matemático $x < (-3)$], además que para cualquier valor de $x \geq (-3)$ la función es positiva y tiene una discontinuidad de tipo agujero o hueco en $x=0$, y una asíntota horizontal en $y = 0$, (eje x).

El análisis algebraico permitió constatar las afirmaciones anteriores de la siguiente forma:

1. La función f , presenta una discontinuidad de tipo agujero o hueco en $x=0$, es decir, que la función en cercanías de $x=0$, tanto por la izquierda como por la derecha se estabiliza o tiende a un valor constante, en

este caso $\left(\frac{1}{2\sqrt{3}}\right)$ que en la tabla se muestra

como una aproximación a 0,2887.

$\lim_{x \rightarrow 0} \left[\frac{\sqrt{x+3} - \sqrt{3}}{x} \right]$, racionalizando se tiene que:

$$\left[\frac{\sqrt{x+3} - \sqrt{3}}{x} \right] \left[\frac{\sqrt{x+3} + \sqrt{3}}{\sqrt{x+3} + \sqrt{3}} \right] \text{ y simplificando}$$

(numerador) como una diferencia de cuadrados se

tiene que: $\frac{x+3-3}{x[\sqrt{x+3} + \sqrt{3}]}$; por lo tanto simplificando

la expresión queda que: $\lim_{x \rightarrow 0} \left[\frac{1}{\sqrt{x+3} + \sqrt{3}} \right]$

sacando el límite se tiene que: el límite de la

función tiende a $\left(\frac{1}{2\sqrt{3}}\right)$, cuando x tiende a

cero por la izquierda y por la derecha.

2. En $y = 0$ hay una asíntota horizontal, porque si x se hace muy grande, es decir x tiende al infinito entonces f tiende a cero, se acerca al eje "X".

$$\lim_{x \rightarrow \infty} \left[\frac{\sqrt{x+3} - \sqrt{3}}{x} \right] = \lim_{x \rightarrow \infty} \left[\frac{\sqrt{x+3} - \sqrt{3}}{\sqrt{x^2}} \right] =$$

$$\lim_{x \rightarrow \infty} \left[\frac{\sqrt{x+3}}{\sqrt{x^2}} \right] - \lim_{x \rightarrow \infty} \left[\frac{3}{\sqrt{x^2}} \right] =$$

$$\lim_{x \rightarrow \infty} \left[\frac{\sqrt{x+3}}{\sqrt{x^2}} \right] - \lim_{x \rightarrow \infty} \left[\frac{3}{\sqrt{x^2}} \right] =$$

$\lim_{x \rightarrow \infty} \left[\frac{\sqrt{x+3}}{\sqrt{x^2}} \right] - \lim_{x \rightarrow \infty} \left[\frac{3}{\sqrt{x^2}} \right]$, aplicando el límite se observa que el primer y segundo términos de la expresión tienden a cero porque el denominador crece más rápido que el numerador. Luego

$$\lim_{x \rightarrow \infty} \left[\frac{\sqrt{x+3}}{\sqrt{x^2}} \right] - \lim_{x \rightarrow \infty} \left[\frac{3}{\sqrt{x^2}} \right] = 0, \text{ lo cual indica la}$$

existencia de una asíntota horizontal en el valor $y = 0$.

La dificultad manifestada por los estudiantes al trabajar con los tres registros de la función propuesta (algebraico, tabular y gráfico) fue notoria y este tipo de dificultad es necesario tratarlo con mucho cuidado con ellos, en el sentido de dedicarle mucho tiempo para recrear las diferentes situaciones que se pueden presentar en el análisis de una función con las representaciones, de tal manera que a los estudiantes no les quede la sensación de haber asistido a varios análisis diferentes de distintas funciones también, sino que por el contrario, todo lo hecho correspondió a la misma función propuesta f , a través de sus diferentes representaciones.

Con el trabajo hecho en las dos clases con los estudiantes, se puede concluir entre otras que:

- El proceso de enseñanza aprendizaje de las matemáticas es una construcción social.
- Quien aprende construye significados, no reproduce simplemente lo que lee o lo que se le enseña.

- Comprender algo supone establecer relaciones con otros elementos. Los fragmentos de información aislados son olvidados o resultan inaccesibles a la memoria.
- Todo aprendizaje depende de conocimientos previos.
- El aprendizaje es individual
- La actitud del que aprende favorece o limita el proceso de enseñanza aprendizaje.
- El aprendizaje también es colaborativo.

BIBLIOGRAFÍA

- ARTIGÜE, M.; ERVYNCK, G. (eds.).1993. Proceedings of Working Group 3 on Students' Difficulties in Calculus, ICME 7, Quebec, Canada. p.52-60
- D'AMORE, B. 2006. Didáctica de la Matemática. Capítulo 8. Matemática, didáctica de la matemática y lenguajes. Editorial Magisterio, Bogotá Colombia, p.251-257.
- DUVAL, R. 1999. Registros semióticos y aprendizajes intelectuales. Universidad del Valle, Grupo de Educación Matemática capítulos II y III. p. 32-45.
- FURIÓ, C.; VILCHES, A. 1997. Las actitudes del alumnado hacia las ciencias y las relaciones ciencia, tecnología y sociedad. En: del Carmen, L. (Coord.). La enseñanza y el aprendizaje de las ciencias de la naturaleza en la educación secundaria. España. Barcelona: Horsori, p.47-71.
- GARBIN, S.; AZCARATE, C. 2000. Esquemas conceptuales e incoherencias con relación al concepto de infinito actual. Educ. Mat. (España). 12(3):27-30.
- GIL-PÉREZ, D.; VILCHES, A. 2001. Una alfabetización científica para el siglo XXI. Obstáculos y propuestas de actuación. Investig. Escuela (España). 43:27-37.
- GIL-PÉREZ, D.; VILCHES, A. 2004. La contribución de la ciencia a la cultura ciudadana. Cultura y Educación. España. p. 23-35.

- GODINO, J. 2007. Seminario Didáctica de la Matemática DIE-UID. Cap. VI Epistemologías de la Matemática. Bogotá, Colombia, p.29-30
- JOHANSEN, I. 2005. Graphic 4.1 Software de uso libre. Disponible desde internet en: <http://www.padowan.dk> (con acceso 03/06/06)
- KUHN, T. 1970. The Structure of Scientific Revolutions, 2ª ed, 1970. trad. Esp.: La Estructura de las revoluciones científicas, Madrid, FCE, 1977. p.15-20.
- RAMÍREZ R., E. 2006. Errores que cometen los estudiantes de primer semestre de ingenierías al resolver problemas de matemáticas. Rev. U.D.C.A Act.& Div. Cient. (Colombia). 9(2):51-61.
- RODRÍGUEZ, G. D. 1998. Ciencia, tecnología y sociedad: Una mirada desde la educación en Tecnología. Rev. Iberoam. Educ. 18:107-143.
- Recibido: Febrero 22 de 2007
Aceptado: Mayo 16 de 2007

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CAUSANTES DE MASTITIS BOVINAY SU RESISTENCIA ANTE ALGUNOS ANTIBACTERIANOS

IDENTIFICATION OF BOVINE MASTITIS CAUSING BACTERIA AND ITS RESISTANCE TO SOME ANTIBACTERIALS

Anastasia Cruz Carillo¹

Carlos E. Estepa²

Jeimy J. Hernández Lizarazo³

Juan Pablo Sanabria Villate³

RESUMEN

La mastitis es una enfermedad común en los hatos lecheros, relacionada con pérdidas económicas importantes para el sector. Paralelamente, el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos ha sido una constante preocupación en la medicina humana y veterinaria. Este estudio, se hizo con el fin de identificar los agentes causales de mastitis clínica y subclínica y su estado de resistencia frente a algunos antimicrobianos, en hatos lecheros del municipio de Duitama, Boyacá. Se evaluaron 541 animales en producción, distribuidos en 25 fincas, 12 con ordeño mecánico y 13 con ordeño manual. Se tomaron muestras de leche de los cuartos positivos a mastitis clínica o subclínica para realizarles cultivo bacteriológico y antibiograma. Se encontró que las bacterias Gram positivas son la principal causa de mastitis

en la zona, siendo el agente causal de mastitis clínica y subclínica más frecuente, *Staphylococcus aureus* con porcentajes de 32 y 42%, respectivamente, seguido de otras especies de *Staphylococcus*. Con menor frecuencia *Streptococcus* sp. fue el agente causal para ambos tipos de mastitis. En cuanto al estado de resistencia, se observó sensibilidad relativa a la oxacilina, tetraciclina y estreptomycin por parte de agentes Gram positivos. Los resultados obtenidos en este estudio ratifican la importancia de conocer las características de la mastitis en cada zona, con el fin de establecer correctamente los tratamientos respectivos.

Palabras clave: Resistencia, mastitis clínica y subclínica, antibacterianos, bacterias

SUMMARY

Mastitis is a common condition in dairy herds, related to important economical losses for the sector. Additionally, the development of resistance to antimicrobians has been a constant preoccupation in human and veterinary medicine. This study was carried out to identify the causal agents of clinical and subclinical mastitis, and its state of resistance in the presence of some antimicrobial in dairy herds in Duitama (Boyacá). 541 animals were

¹ M.V. Esp. U.N. Docente de Planta, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, UPTC. Programa de Medicina Veterinaria-Zootecnia. Grupo GICIVET. anicata22@hotmail.com

² M.V. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Docente ocasional, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Programa de Medicina Veterinaria-Zootecnia.

³ M.V.Z. UPTC.

evaluated in production, distributed in 25 farms, 12 with mechanical milking, and 13 with manual milking. Milk samples were taken from the positive quarters of clinical or subclinical mastitis for bacteriological culture and an antibiogram. It was found that the gram positive bacteria are the main cause of mastitis in the area, being the *Staphylococcus aureus* the causal agent of the most frequent clinical and subclinical mastitis, with percentages between the 32 to 42% respectively. With less frequency, the *Streptococcus* sp. was the causal agent for both types of mastitis. As for the resistance state, we observed a relative sensibility to oxacinlin, vancomycin, tetracilin and streptomycin by the gram positive agents. The results obtained in this study ratify the importance of knowing the mastitis characteristics in each area in order to establish the right treatments.

Keys Words: Resistance, clinic mastitis, subclinic mastitis, antibiotics

INTRODUCCIÓN

La mastitis es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria, caracterizada por alteraciones físicas y químicas de la leche, representadas por el número de células somáticas de ésta, por la presencia de microorganismos y por alteraciones patológicas de la ubre. Ocurre como respuesta de los tejidos secretores a lesiones traumáticas, a sustancias irritantes o bien, a la presencia de toxinas producidas por microorganismos que han llegado a la ubre (Miller & Bartlett, 2004).

La mastitis subclínica, se caracteriza por la ausencia de signos de inflamación en la ubre y por la apariencia normal de la leche; sin embargo, los microorganismos y las células blancas de la leche (células somáticas), se encuentran elevados en gran número (Pérez, 2005). En la mastitis clínica, el cuarto infectado se inflama, hay dolor, edema, la leche tiene coágulos y grumos y se torna amarilla o rojiza por la presencia de sangre. En casos severos hay fiebre, decaimiento, pulso acelerado, pérdida de apetito y baja la producción (Guterbock *et al.* 1993).

A nivel mundial, se estima que el 10% de los casos de mastitis, corresponden a la forma clínica y cerca del 90% son del tipo subclínico. En algunos reportes nacionales, se indica que el microorganismo más común

causante de mastitis es el *Streptococcus agalactiae* (40%), seguido por *Staphylococcus aureus* (30 - 40%), *Streptococcus* ambiental con (5 - 10%) y coliformes (1%) (Cotrino, 2003; Ruiz *et al.* 2001).

En el municipio San Pedro de los Milagros (Antioquia) en 1999, se encontró una prevalencia de mastitis por cuarto de 12,3% y en el cultivo, las bacterias más frecuentes fueron *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus coagulasa* positiva y *S. aureus* con valores de 47%, 14,6% y 13%, respectivamente (Ramírez & Gaviria, 2001; Ruiz *et al.* 2001).

En el 2004, la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, en el municipio de Belén, aisló a partir de vacas diagnosticadas con mastitis 21,4% de *Streptococcus* como agente causal, siendo el *S. viridans* el microorganismo más común en vacas pertenecientes a explotaciones con ordeño mecánico. *Staphylococcus* sp. fue aislado en 14,2% de los casos y estando más frecuente en animales ordeñados de forma manual. Se aisló *S. aureus* solo en 7,1% de los casos, más frecuentemente en ordeño mecánico (Cely & Meneses, 2004).

Según el Dr. Germán Rodríguez, la Universidad de La Salle realizó un trabajo en el Alto Chicamocha (Boyacá), utilizando la prueba de California Mastitis Test (CMT), en época de lluvia y de sequía. En el verano muestrearon 3344 cuartos, de los que 50,5% fueron negativos, 16,82% fueron grado uno, 14,47% grado dos, 11,84% grado tres y, en grado 4, se encontraron 5,17%. El porcentaje de mastitis clínica fue 0,32% y los cuartos perdidos 0,92%.

Casos de resistencia de *S. cohnii* y *S. aureus* a antibióticos han sido detectados a nivel mundial. Razas de *S. aureus* con susceptibilidad reducida a glicopéptidos se reportan de Japón, Estados Unidos, Europa y Lejano Oriente (Tenover *et al.* 2001), mientras que Martínez & Mattar (2006), registran un caso de posible resistencia de *S. cohnii* a vancomicina.

Por otra parte, la resistencia es una mutación genética desarrollada por los agentes infecciosos con fines adaptativos, para resistir los efectos producidos por los fármacos ante los cuales son susceptibles. Los genes de resistencia pueden estar ubicados en el ADN de la bacteria o como ADN extranuclear (plásmido) y se transmiten de una bacteria a otra (Klement *et al.* 2005; San Martín *et al.* 2002).

El objetivo principal de este estudio fue el de conocer los agentes más frecuentes causantes de mastitis clínica y subclínica y su estado de resistencia a los antimicrobianos en los hatos lecheros de la zona de Duitama (Boyacá), para proporcionar a los Médicos Veterinarios de la zona, una herramienta para la elección del tratamiento de la mastitis.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio, se realizó en el municipio de Duitama, Boyacá, perteneciente a la región geográfica Andina, ubicado en el altiplano Cundiboyacense. Predomina el clima frío húmedo con terrenos ubicados entre los 2500 y 3000msnm; temperatura promedio 15°C, promedio de precipitación 1128mm; la humedad relativa 81,4% y la evaporación oscila entre 80,63mm y 99,53mm. Se encuentran explotaciones de ganadería de leche de tipo semi-intensivo e intensivo, manejan praderas de kikuyo y en algunos lugares lo combina con avena, alfalfa, ray grass y trébol.

Animales de Experimentación. Los animales que se tomaron para el muestreo fueron hembras bovinas en producción, de las razas Holstein, Normando y, en menor proporción, Jersey, Pardo Suizo y sus cruces. Se realizó el muestreo sin considerar edad, tiempo de producción o etapa de lactancia, la única condición fue estar en producción. En la mayoría de predios vermifugan una vez al año con albendazol, febendazol y triclobendazol; suplementan con sal mineralizada, calcio o productos vitamínicos y en casi todos vacunan contra aftosa y brucella.

La zona rural del municipio está conformada por 19 veredas, de las cuales diez fueron consideradas en este estudio, por corresponder a la parte sur del municipio, que es la zona con mayor actividad lechera. De acuerdo con la información suministrada por la Unidad Municipal de Asistencia Técnica Agropecuaria (UMATA), el municipio cuenta con 5974 hembras bovinas, de las cuales 3952 son hembras mayores de tres años. Estos ejemplares, se encuentran ubicados en 38 predios, de los cuales se seleccionaron 25 al azar; el número de muestras, se obtuvo con la aplicación de la siguiente fórmula (Zapata, 2000):

$$n = \frac{N Z^2 S^2}{Z^2 S^2 + NE^2}$$

n = tamaño de la muestra; N = tamaño de la población; E = error máximo (0,05); S²=varianza de la población (0,25); Z = coeficiente de varianza (1,96).

De las 19 veredas tenidas en cuenta, diez se seleccionaron para este estudio, incluyendo solo los predios que tuvieran mínimo 19 hembras en producción. De las 25 explotaciones incluidas, 13 hatos cuentan con ordeño manual y 12 con ordeño mecánico (Tabla 1).

Toma y envío de muestras. El examen clínico de la ubre, la inspección de la leche y la toma de muestras, se realizó durante el ordeño de la mañana, respetando las rutinas de la finca. La prueba de CMT, se hizo como la describe la literatura (Sargeant *et al.* 2001). De cada cuarto afectado, se tomó una muestra en tubo de ensayo estéril, habiendo desechado previamente los primeros chorros. Cada muestra fue identificada, colocada en una cava de icopor con hielo e inmediatamente remitida al Centro de Diagnóstico Veterinario del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) Sogamoso, donde se realizaron las pruebas.

Pruebas microbiológicas. Para la identificación de microorganismos, las muestras de leche se cultivaron inicialmente en agar sangre en el que crecen gran cantidad de bacterias y en agar MacConkey, que se utiliza para identificación de microorganismos Gram negativos, especialmente esterobacterias (Granados & Villaverde, 2002). Cumplidas 24 horas de incubación, se procedió a hacer la lectura y solo cuando no hubo crecimiento bacteriano, las muestras se reincubaron y leyeron a las 48 horas. Posteriormente, se realizó la tinción de Gram para diferenciar bacterias Gram positivas y negativas.

Buscando diferenciar los *Streptococcus* de los *Staphylococcus*, se hizo la prueba de catalasa. Aquellos microorganismo que fueron catalasa positivos, se identificaron como *Staphylococcus* y los catalasa negativos como *Streptococcus*. Debido a la importancia que, de acuerdo con otros reportes, muestra el *S. aureus* como agente causante de mastitis (Revelli & Rodríguez, 2001; Valencia & Jurado, 2003), se hizo la prueba de coagulasa, para identificar esta bacteria, que resulta positiva a la

Tabla 1. Cantidad de vacas muestreadas y tipo de ordeño en los predios y veredas del municipio de Duitama, consideradas en el estudio.

VEREDA	PREDIO	IDENTIFICACIÓN FINCA	No. DE VACAS MUESTREADAS	TIPO DE ORDEÑO
San Lorenzo de Abajo	Fátima	A	19	Manual
	El Alcaparral	B	21	Manual
	La Chata	C	23	Manual
	Las Vegas	E	18	Manual
	El Porvenir	F	17	Manual
	Londres	H	20	Manual
	La Cabaña	J	24	Manual
Higueras	Las Manitas	D	35	Manual
	Santa María	L	28	Mecánico
	Santa Ana	M	17	Mecánico
	San Lorenzo	O	22	Mecánico
Agua tendida	Buyara	G	24	Mecánico
	La Esperanza	I	18	Mecánico
	Villa Constanza	Z	18	Mecánico
San Luís	San Fernando	K	26	Manual
	Santa Teresa	P	18	Manual
San Antonio norte	La Estación	N	19	Mecánico
Tocogua	La Ilusión	Ñ	17	Manual
Surba y Bonza	Versalles	R	22	Mecánico
	Casa Linda	S	24	Mecánico
Sirata	San Carlos	T	19	Manual
San Lorenzo de arriba	Silva Plazas	U	18	Manual
	Villa Rocío	Y	22	Mecánico
Quebrada de Becerras	El Rincón	V	20	Mecánico
	El Recuerdo	X	32	Mecánico

prueba. Aquellas muestras catalasa positivas y coagulasa negativas, se identificaron como *Staphylococcus* spp. (Granados & Villaverde, 2002; Perreten *et al.* 2005; Ruiz *et al.* 2001).

Las bacterias que crecieron en el agar MacConkey fueron sometidas a pruebas bioquímicas que permitieron identificarlas. Las bacterias lactofermentadoras son *Echerichia coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter* y las no lactofermentadoras, *Salmonella* y *Shigella*. Se utilizó el agar triple azúcar hierro, para detectar la fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa. La producción de H₂ por liberación de azufre determina la presencia de *Citrobacter*. Por otra parte, el agar de hierro lisina se utilizó para identificar la producción de las enzimas lisina descarboxilasa, lisina deaminasa y, eventualmente, la producción de H₂ s y gas. Esta prueba determina, por un cambio de pH, un viraje en el color, que se relaciona con la presencia de *E. coli*, *Klebsiella* sp. y *Citrobacter freundii*. Para confirmar la presencia de bacilos Gram negativos, se realizó la prueba en agar citrato.

La presencia o ausencia de flagelos en microorganismos, como *Corynebacterium*, no fermentadores Enterobacterias, *Pseudomonas*, *Brucella* y *Bordetella*, se comprobó en agar de motilidad. Para complementar la identificación de microorganismos, se utilizaron caldos de malonato, rojo de metileno y Voges Poskaue (enterobacterias) (Granados & Villaverde, 2002).

Una vez los diferentes microorganismos fueron identificados, se seleccionaron cuatro colonias para ser transferidas a caldo nutritivo, Mueller Hinton o de triplicasa de soya, utilizados para hacer, posteriormente, el antibiograma. La incubación, se hizo a 37°C por dos a seis horas, con el fin de conseguir la turbidez del tubo 0,5 de la escala de MacFarland. El inóculo tomado de dichos cultivos, fue sembrado en rejilla para pasados cinco minutos, ponerlo en contacto con los sensidiscos de amoxicilina (25mcg), cefalexina (30mcg), gentamicina (10mcg), oxitetraciclina (30mcg), trimetropim sulfa (25mcg), cefaperazona (30mcg), cloxacilina (5mcg), oxacilina (10mcg), eritromicina (15mcg), penicilina G potásica (10mcg), estreptomycin (10mcg), ampicilina (10mcg) y tetraciclina (30mcg). La distancia entre cada uno fue de 24mm. Pasadas 24 horas, se procedió a hacer la lectura, midiendo el diámetro de la zona de completa inhibición del crecimiento. Cuando en diámetro de inhibición superaba 14mm, se interpretaba como sensibilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 25 fincas evaluadas se encontró que en 12 de ellas se usaban ordeño mecánico y en 13 ordeño manual. El total de animales muestreados fue 541 (2164 cuartos), de los cuales 147 fueron positivos a mastitis subclínica en uno o más de sus cuartos (Tabla 2), con un total de 1965 cuartos positivos. De manera similar a como se

Tabla 2. Número de cuartos positivos o negativos a mastitis clínica y subclínica y número de cuartos perdidos.

CLASIFICACIÓN DE LA LESIÓN	NÚMERO DE CUARTOS	PORCENTAJE (%)
Negativo	1965	90,81
Mastitis subclínica grado 1	65	3,0
Mastitis subclínica grado 2	61	2,8
Mastitis subclínica grado 3	45	2,07
Mastitis subclínica grado 4	15	0,69
Mastitis clínica	6	0,27
Cuarto perdido	7	0,32
TOTAL	2164	100

observa en los estudios adelantados en Paipa, Belén, Sotaquirá, Duitama y Santa Rosa, la presentación de mastitis clínica y de cuartos perdidos en este estudio, fue baja, llegando solo a 0,27% (6 cuartos) y 0,32% (7 cuartos), respectivamente, valor que corresponde a 6 animales de los 541 muestreados (Cely & Meneses, 2004; Rodríguez & Moreno, 2005). A pesar de la importancia que representa esta situación en una producción lechera, cinco predios es un valor mínimo, teniendo en cuenta que las explotaciones incluidas en este estudio no son altamente tecnificadas.

El total de cuartos positivos a CMT, en alguno de sus grados, fue de 192 cuartos representando 8.87% de los muestreados, lo que no coincide con los estudios realizados por Rodríguez & Moreno (2005) y Cely & Meneses (2004), en los que superaron el 45%. Se podría pensar que en Duitama no existe una elevada presencia de mastitis en comparación con los demás municipios del cordón lechero de Boyacá, hecho que se puede atribuir a la situación sociocultural del municipio, pues su desarrollo facilita la adquisición de insumos para control y tratamiento de la enfermedad y la capacitación del personal a cargo de la rutina de ordeño. A pesar de que se encontraron solo 2,77% de los cuartos con mastitis subclínica grado tres o cuatro, se resalta la necesidad de controlar esos casos para evitar su evolución a mastitis clínica (Guterbock *et al.* 1993).

En lo referente al aislamiento bacteriano, de las 192 muestras cultivadas solo en 76 (39,5%) se observó crecimiento bacteriano, por lo que 116 muestras (60,4%) resultaron negativas a la identificación bacteriana. Estos hallazgos fueron similares a lo reportado en el municipio Belén donde hubo crecimiento bacteriano en 44,1% de las muestras positivas a CMT. Basados en los diferentes estudios realizados a nivel mundial, se puede considerar que la mastitis es causada principalmente por bacterias Gram positivas, seguida de microorganismos Gram negativos (Revelli & Rodríguez, 2001). Los estudios indican que entre 87% y 95% de las mastitis son causadas por bacterias Gram positivas y el porcentaje restante por Gram negativas, así mismo, que la mastitis subclínica es más frecuente (60-90%) que la mastitis clínica (Ávila *et al.* 2002; Revelli & Rodríguez, 2001; Ruiz *et al.* 2001; Valencia & Jurado, 2003). En varios estudios realizados en diferentes países, las dos bacterias más importantes para mastitis han sido *Streptococcus* y *Staphylococcus*

y con menor incidencia *E. coli*, aunque se reportan bacterias emergentes como el *Corynebacterium* sp. (Faría *et al.* 2005; Tenhagen *et al.* 2006).

En este trabajo, con una tendencia similar a la encontrada por Valencia & Jurado, (2003) y por Rivelli & Rodríguez (2001), el microorganismo más frecuente fue *S. aureus*, que es uno de los agentes etiológicos de la mastitis contagiosa más comunes. En el altiplano cundiboyacense, 60% de los casos positivos a mastitis, corresponden a *S. aureus*, seguidos por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. y coliformes; sin embargo, en otros estudios, hubo mayor frecuencia de *Streptococcus* sp., seguido de *Staphylococcus* sp. (Cely & Meneses, 2004; Rodríguez & Moreno, 2005; Cotrino, 2001). En varios países, se muestra que la mastitis causada por microorganismos contagiosos disminuye año a año, pero aumenta la causada por otros agentes (Pitkälä *et al.* 2004).

En los cuartos muestreados en este trabajo, se aisló *S. aureus* para mastitis clínica en 32% de los casos y para subclínica en 41% de ellos (Tabla 3). Igualmente, esta bacteria se aisló en mayor proporción en animales manejados con ordeño mecánico, coincidiendo con los datos registrados por Cely & Meneses (2004). Este resultado es esperable debido a que esta bacteria tiene como reservorio principal la glándula mamaria, permitiendo que las pezoneras sean el medio de transmisión, cuando no son correctamente desinfectadas. Aunque en este estudio no se incluyó el análisis de la rutina de ordeño en los predios, se sabe que la mayor incidencia de bacterias contagiosas se encuentra cuando no se usan selladores de pezón después de cada ordeño (Galton, 2004).

Staphylococcus sp. fue encontrado con mayor frecuencia en los casos de mastitis subclínica (29%) que en los de la forma clínica de la enfermedad (17%). Sin embargo, mostró la misma prevalencia que el *Streptococcus* sp. causando mastitis clínica. Esta tendencia de presentación fue similar a lo reportado en los estudios en San Pedro de los Milagros, Antioquia (Ramírez & Gaviria, 2001). En el presente trabajo, el microorganismo se aisló con mayor frecuencia en explotaciones con ordeño manual, lo que puede atribuirse a las manos del ordeñador y a las inadecuadas condiciones de higiene en instalaciones y rutina de ordeño (Tabla 3).

Tabla 3. Prevalencia de microorganismos de acuerdo con el tipo de ordeño.

AGENTE ETIOLÓGICO	ORDEÑO MECÁNICO		ORDEÑO MANUAL	
	No muestras	Porcentaje %	No muestras	Porcentaje %
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	56	19	35,8
<i>Staphylococcus sp.</i>	0	0	15	28
<i>Streptococcus sp.</i>	8	35	16	30
<i>Escherichia coli</i>	1	4	0	-
<i>Klebsiella ozaenae</i>	1	4	2	4
<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	1	1,8
TOTAL	23	100	53	100

Streptococcus sp., en frecuencia, fue la segunda bacteria causante de mastitis. Se aisló en 26% y 17% de los casos de mastitis subclínica y clínica, respectivamente (Tabla 3). Fue mayor en ordeño mecánico que en el manual y puede ser atribuida a lesiones en los pezones o a la capacidad que tiene de infectar la ubre de las terneras, permaneciendo indefinidamente en su glándula mamaria (Pitkälä *et al.* 2004).

Las bacterias Gram negativas presentaron menor porcentaje en los aislamientos, destacándose *K. ozaenae* en 17% de las mastitis clínicas y en 3% de las subclínicas, teniendo igual porcentaje en los dos tipos de ordeño. En varios trabajos, se encuentra que esta bacteria no es frecuentemente aislada, aunque en algunos países es la más importante (Cely & Meneses, 2004; San Martín *et al.* 2002). A pesar de que en varios países del mundo se ha reportado *E. coli* y *Klebsiella* como unas de las bacterias que con más frecuencia produce mastitis clínica, en los reportes realizados en Colombia, incluyendo el presente trabajo, la incidencia es baja a pesar de ser una bacteria que habita comúnmente el medio ambiente (Guterbock *et al.* 1993). En este estudio, se aisló *Citrobacter freundii* (una muestra de mastitis subclínica en ordeño manual), el cual no se reporta en ninguno de los estudios nacionales referenciados.

En cuanto al estado de resistencia encontrado en este estudio, las bacterias Gram positivas presentaron diferentes grados de resistencia ante los antimicrobianos evaluados, que ordenada de forma decreciente fue, estreptomycin (74%), oxacilina (50%), penicilina G potásica (42%), tetraciclina (33.8%), eritromicina (30.6%), cloxacilina (26.4%) y ampicilina (24%); mientras que para los microorganismos gram negativos fueron trimetropim sulfa (60%), cefalexina (46%), amoxicilina (40%), y con 28,5% cefaperazona, oxitetraciclina y gentamicina (Tabla 4).

Del total de muestras se aislaron 30 para *S. aureus*, presentando mayor resistencia a la estreptomycin y oxacilina con 83,3% (25/30) y 60%(18/30), respectivamente. *Streptococcus sp.* mostró 73,6% (14/19) de resistencia a estreptomycin, a tetraciclina 63.1% (12/19), a penicilina G potásica 63.1% (12/19) y *Staphylococcus sp.*, 41% (9/22) a oxacilina (Tabla 4). La penicilina G sódica y la oxacilina tienen alta eficacia contra gérmenes gram positivos, en tanto que solo las bacterias Gram negativas y *Staphylococcus* son sensibles a la estreptomycin. Por tal razón, *Streptococcus sp.* en forma natural es resistente a este antibiótico (Cottrino, 2003; Cué & Morejón, 1998).

Por otra parte, *Staphylococcus sp.* mostró 41% de resistencia frente a la oxacilina, de manera diferente a

Tabla 4. Porcentaje de resistencia antimicrobiana de las bacterias gram positivas aisladas.

AGENTE ETIOLÓGICO	Ob	Ox	E	S	Te	P	Am
<i>Staphylococcus aureus</i>	16,6	60	33,3	83,3	30	36,6	16,6
<i>Streptococcus</i> sp.	21	36	31,5	73,6	63,1	63,1	21
<i>Staphylococcus</i> sp.	27,2	41	13,6	31,8	0	18,1	13,6

Ob = cloxacilina; Ox= oxacilina; E= eritromicina; Te= tetraciclina; P= penicilina G potásica; Am= ampicilina

lo reportado en San Pedro de los Milagros, donde se encontró una sensibilidad de 100% (Ramírez & Gaviria, 2001). Esto demuestra una vez más, que los estados de resistencia varían de una zona a otra y dependen de la presión de selección ejercida por frecuente uso de antibacterianos.

En razón a que muchos de los antimastóticos comercializados en Colombia contienen aminoglicósidos, en este estudio se quiso demostrar el poco efecto de este antibiótico sobre *Streptococcus*, así como la alta resistencia que adquieren los *Staphylococcus*. Es de resaltar que los aminoglicósidos son altamente eficaces contra Gram negativos y poco efectivos contra gérmenes Gram positivos. Tal como se esperaba, se obtuvo un grado de resistencia de estas bacterias equivalente a 74%.

Corroborando lo anterior, se encontró alta resistencia del *S. aureus* a estreptomina, siendo ésta un tipo de resistencia natural más que adquirida. Hubo resistencia a oxacilina, 60% de manera similar a otros estudios (Tenhagen *et al.* 2006; Rabello *et al.* 2005).

Únicamente, la *Klebsiella ozaenae* presentó un 66,6% de resistencia a trimetropim sulfa, gentamicina y ampicilina; el *C. freundii* y *E. coli* presentaron sensibilidad a oxitetraciclina, cefalexina, cefaperazona, amoxicilina, gentamicina y en especial a trimetropim sulfa; a pesar de que la cefalexina no es indicada para este tipo de bacterias, en este estudio las pocas muestras aisladas no presentaron resistencia (Tabla 5). Estos resultados fueron a similares los reportados por San Martín *et al.* (2002).

Tabla 5. Porcentaje de resistencia antimicrobiana de las bacterias gram negativas aisladas.

AGENTE ETIOLÓGICO	ANTIMICROBIANOS EMPLEADOS PARA ANTIBIOGRAMA					
	Aml	Sxt	Cl	Cfp	Ot	Gm
<i>Klebsiella ozaenae</i>	66,6	66,6	10	33,3	33,3	66,6
<i>Citrobacter freundii</i>	33,3	0	0	33,3	0	33,3
<i>Escherichia coli</i>	33,3	0	33,3	33,3	0	0

Aml= amoxicilina; Sxt= trimetropim-sulfa; Cl= cefalexina; Cfp= cefoperazona; Ot= oxitetraciclina; Gm gentamicina

La cloxacilina y amoxicilina aparecieron para el tratamiento de mastitis en el 2002 según la ONU para la Agricultura y Alimentación presentando una sensibilidad del 100%; no obstante en la investigación la cloxacilina y amoxicilina presentaron cierto grado de resistencia. Para amoxicilina es un resultado esperado pues es un antibiótico sensible a la beta lactamasa, pero en el caso de cloxacilina genera alarma porque este antibacteriano se considera resistente a la enzima, lo que lleva a pensar que se han generado nuevos mecanismo de resistencia y corrobora la presencia de diferentes tipos de enzimas (Pitkälä *et al.* 2004).

CONCLUSIONES

Se puede indicar que la mastitis clínica presenta baja prevalencia en la zona estudiada y que fue superada notoriamente por los casos encontrados de mastitis subclínica. Por otra parte y en razón a que en el presente estudio no se tuvo en cuenta la etapa de lactancia, el tiempo de producción ni la edad de la hembras muestreadas, se encontraron falsos positivos con el CMT, lo cual no alteró los resultados, debido a que la presencia de bacterias en dichas muestras se corroboró con los cultivos bacteriológicos. Es así como sin ser el CMT una prueba 100% confiable, constituye una herramienta importante por costos y facilidad de aplicación, para el control de esta enfermedad en las explotaciones, con una sensibilidad de aproximadamente el 50% (Sargeant *et al.* 2001).

Con una tendencia muy similar a otros estudios desarrollados en Colombia y Sur América, se observó que las mastitis en la zona estudiada, son en su mayoría causadas por microorganismos gram positivos (93%) y muy poco por gram negativos. Se puede indicar que en el municipio de Duitama, *Staphylococcus sp.* y especialmente *S aureus* es la bacteria causante de mastitis, seguida por *Streptococcus sp.* y con baja prevalencia por las bacterias Gram negativas.

Considerando que las bacterias Gram positivas, especialmente *S. aureus* y *Streptococcus sp.*, mostraron alta resistencia (73,6%-83,3%) a la estreptomina y que fueron éstas las principales bacterias causantes de mastitis en el municipio de Duitama, este antibacteriano no debería ser considerado en la terapéutica de esta patología en la zona. Muchos de los medicamentos antimastíticos que se comercializan en Colombia incluyen la asociación penicilinas – aminoglicósidos, lo cual, basados en los

resultados de este estudio, es una elección inadecuada. Es importante recordar que el uso de antibacterianos ineficaces para ciertos microorganismos propicia el desarrollo de resistencia.

Es de resaltar que hubo un grado relativamente alto de resistencia a la oxacilina por parte de los microorganismos Gram positivos, principalmente de *S. aureus*. Este hallazgo es importante en razón a que el antibacteriano es específico contra agentes Gram positivos y es resistente a ciertos tipos de beta-lactamasa. Sin embargo, las bacterias generan diferentes tipos de resistencia y logran sintetizar varios tipos de enzimas capaces de inactivar los fármacos. Este tipo es un ejemplo claro de resistencia adquirida que ha llevado a que un fármaco, que de forma natural era eficaz, con el tiempo pierda su capacidad antibacteriana.

Las penicilinas naturales, la eritromicina y la cefalexina, aunque son antibacterianos de alta eficacia contra bacterias Gram positivas, el desarrollo de resistencia ha llevado a que su eficacia se vaya perdiendo. Es así como esto se considera importante, en razón a que estos tres antibacterianos son de primera elección en el manejo de mastitis en nuestro medio.

RECOMENDACIONES

Se enfatiza en la necesidad de conocer los conceptos epidemiológicos básicos de las enfermedades infecciosas en cada zona del país, así como el estado de resistencia de los agentes causales ante los fármacos utilizados, buscando aplicar la terapia farmacológica de primera elección y minimizar el riesgo de desarrollo de resistencia. La resistencia aumenta año tras año, por lo cual es necesario repetir este tipo de estudios periódicamente, para determinar la evolución de ésta y los cambios que puedan ocurrir en cuanto a los agentes etiológicos de la mastitis.

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo dan sinceros agradecimientos al Dr. Darío Vaca, entonces director del Centro de Diagnóstico Veterinario del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) Duitama y a Rocío Socha, Bacterióloga del mismo.

BIBLIOGRAFÍA

- ÁVILA, T.S.; GUTIÉRREZ, C.A.S.; SÁNCHEZ, G.J. 2002. Comparación del estado de salud de la ubre y calidad sanitaria de la leche en vacas ordeñadas manual y mecánicamente. *Veterinaria México*. 33 (4):134-138. Disponible desde Internet en <http://scielo-mx.bus.br/scielo.php> (con acceso 08/12/06).
- CELY, M.; MENESES, R. 2004. Aislamiento e identificación de bacterias presentes en casos de mastitis subclínica en hatos lecheros en el municipio de Belén. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario y Zootecnista Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Tunja, Boyacá. 85p.
- COTRINO, V. 2001. Diagnóstico y tratamiento de la mastitis. Memorias de la Ponencia en el Congreso Panamericano de la Calidad de la Leche y la Mastitis. Bogotá. p.64-67.
- COTRINO, V. 2003. Diagnóstico de mastitis. Disponible desde Internet en: www.imvltda.com/programas/ar16.html (con acceso 20/02/06).
- CUÉ, M.B.; MOREJÓN G.M. 1998. Antibacterinos de acción sistémica. Parte II. Otros grupos de antibióticos". *Rev Cubana Med Gen Integr*. 14(4):362-373.
- FARÍA, J.F.R.; VALERO-LEAL, K.; D`POOL, G.; GARCÍA, U.A.; CAGNASSO, M.A. 2005. Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito. *Rev. Cient. (Venezuela)*.15(3):1103-1106.
- GALTON, D.M. 2004. Effects of an automatic postmilk-ing teat dipping system on new intramammary infections and iodine in milk. *J. Dairy Sci*. 87:225-231.
- GRANADOS, P.R.; VILLAVERDE, P.M.C.. 2002. *Microbiología* 2 ed. Vol. II: "Bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas. *Micología general*. Parasitología general. Cap. 1, 4, 8. Paraninfo, Thomson Learning. México. p.24-45; 65-67; 90-93.
- GÜTERBOCK, W.; EENENNAAM, R.; ANDERSON, J. 1993. Efficacy of intramammary antibiotic therapy for treatment of clinical mastitis caused by environmental pathogens. *J. Dairy Sci*. 76(11):3437-3439.
- KLEMENT, E.; CHAFFER, M.; LEITNER, G.; SHWIMMER, A.; FRIEDMAN, S.; SARAN, A. Y. SHPIGEL, N. 2005. Assessment of accuracy of disk diffusion tests for the determination of antimicrobial susceptibility of common bovine mastitis pathogens: a novel approach. *Microbial Drug Res*. 11(4):342-350.
- MARTÍNEZ, P.; MATTAR, S. 2006. Posible aislamiento clínico de *Staphylococcus cohnii* resistente a vancomicina. *Infecto*. 10(3)175-177.
- MILLER, G.; BARTLETT, P. 2004. Economic effects of mastitis prevention strategies for dairy producers. *J. Am.Vet. Med. Assoc*. 198(2):227-231.
- PÉREZ, R. 2005. La Mastitis un enemigo de la rentabilidad. Memorias de la Ponencia en el Seminario Nacional de Actualización en Sanidad y Producción Bovina, organizado por la Gobernación de Cundinamarca, Bogotá-Colombia. p.23-27.
- PERRETEEN, V.; VORLET, F.; SLICKEERS, P.; EHRLICH, R.; KUHNERT, P.; FREY, J. 2005. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of Gram positive bacteria. *J. Clin. Microb*. 43 (5):2291-2302
- PITKÄLÄ, A.; HAVERI, M.; PYÖRÄLÄ, S.; MYLLYS, V. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001—prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci*. 87:2433-2441.
- RABELLO; R.F.; SOUZA, C.R.; DUARTE, R.S.; LOPES, R.M.; TEIXEIRA L.M.; CASTRO, A.C. 2005. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro Brazil. *J. Dairy Sci*. 88 (9):3211-3219.

- RAMÍREZ, N.; GAVIRIA, G. 2001. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio San Pedro de los Milagros. Antioquia. Rev. Col. Cienc. Pec. 4(1):76-79.
- REVELLI, G.; RODRÍGUEZ, C. 2001. Prevalencia de agentes etiológicos causales de mastitis bovina en la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero. Respuesta a la sensibilidad antimicrobiana. Rev. Electrónica de Veterinaria. 4(23):56-58.
- RODRÍGUEZ, G.; MORENO, F. 2005. Evaluación y caracterización de la calidad sanitaria e higiénica de la leche producida en la región del Alto Chicamocha, departamento de Boyacá. Proyecto de investigación en trámite de publicación. Información suministrada por los autores.
- RUIZ, J.D.; RAMÍREZ, N.F.; ARROYAVE, O. 2001. Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros. Antioquia. Rev. Col. Cienc. Pec. 14 (2):143 –154.
- SAN MARTIN, B.; KRUIZE, J.; MORALES, M.A.; AGÜERO, H.; LEÓN, B.; ESPINOZA, S.; IRAGÜEN, M.V.; PUGA J. BORIE, C. 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile. Arch. Med. Vet. (Chile). 34(2):102-105
- SARGEANT, J.M.; LESLIE, K.E.; SHIRLEY J.E. 2001. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California mastitis test for identifying intramammary infection in early lactation. J. Dairy Sci. 84:2018-2024.
- TENHAGEN, B.A.; KOSTER, G.; WALLMAN, J.; HEUWIESER, W. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. J. Dairy Sci. 89(7):2542-2551.
- TTENOVER, F.C.; BIDDLE, J.W.; LANCASTER, M.V. 2001. Increase resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. Emerg. Infect. Dis. 7:327-332.
- VALENCIA, H.; JURADO, F. 2003. Aislamiento e identificación de microorganismos causantes de mastitis subclínica y su sensibilidad a antibacterianos, en hatos lecheros del sur occidente de Pasto. Rev. Col. Cienc. Pec. 16. Suplemento No. 16: 16-22.
- ZAPATA, E. 2000. Investigación de Mercado. Tunja: IDEAD Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. 98p.

Recibido: Octubre 2 de 2006

Aceptado: Marzo 5 de 2007

***Listeria monocytogenes* EN CANALES DE BOVINOS CEBÚ EN UNA PLANTA DE SACRIFICIO DE LA SABANA DE BOGOTÁ (COLOMBIA)**

***Listeria monocytogenes* IN CARCASSES OF CEBU BOVINES IN A SLAUGHTERHOUSE OF THE SAVANNAH OF BOGOTÁ (COLOMBIA)**

Diana Villamill¹
Manuel I. Gallego M.²
Orlando A. Torres³
María Fernanda Ramírez⁴

RESUMEN

L. monocytogenes es un cocobacilo Gram-positivo que se encuentra en forma ubicua en el suelo, agua, vegetales, leches crudas, carnes y derivados cárnicos. Este microorganismo ha sido considerado un problema importante de salud pública especialmente para personas inmunodeprimidas, mujeres embarazadas, ancianos y niños. Estudios anteriores realizados en Colombia han demostrado la presencia del microorganismo en leches y quesos crudos, lo mismo que en conglomerados lecheros y en canales de bovinos Holstein. Con el fin de continuar los estudios relacionados con la epidemiología de la enfermedad y su importancia en Salud Pública, se realizó el presente trabajo para determinar la presencia

de *L. monocytogenes* en canales de bovinos raza Cebú, en una planta de sacrificio. Se examinaron 120 canales de una población de 1600 animales sacrificados en un periodo de dos meses. Las muestras, se tomaron en cuatro puntos diferentes (cadera, falda, pecho, cuello), obteniendo diez canales contaminadas con *L. monocytogenes*, lo cual indica un grado de contaminación del 8,33% con un rango entre 3,4% y 13,2% demostrand, de esta manera, el alto riesgo que puede constituir para la población el consumo de carnes contaminados. Con el fin de prevenir la contaminación en las carcasas de los animales, destinados al consumo humano es necesario establecer planes de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP) en las fincas destinadas a la crianza de animales para sacrificio, durante las etapas previas al sacrificio y durante todo el proceso de faenado de los animales.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, plantas de sacrificio, salud pública, listeriosis, HACCP.

SUMMARY

Listeria monocytogenes is a Gram-positive cocobacillus that has been isolated from soil, water, vegetables, raw milk, meat and meat byproducts. This micro-organism

¹ Estudiante de Pregrado. Carrera de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana .villamill.d@javeriana.edu.co. jalymikro@hotmail.com Bogotá, Colombia.

² M.V.Z., M.Sc, Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, mgallego@udca.edu.co. Bogotá, Colombia.

³ M.V., M.Sc. Facultad de Microbiología Agrícola. Pontificia Universidad Javeriana otorres@javeriana.edu.co Bogotá Colombia.

⁴ M.V. Directora Planta de Sacrificio. Chía, Colombia.

has been considered an important problem of public health especially in immunodepressed and elderly people, children and pregnant women. Previous studies made in Colombia have demonstrated the presence of the micro-organism in milk and crude cheeses, as well as in milk cow conglomerates and Holstein carcasses. With the purpose of continuing the studies related to the epidemiology of the disease and its importance in public health, the actual work was made to determine the presence of *L. monocytogenes* in carcasses of Cebu cattle, in a slaughterhouse of the Savannah of Bogotá (Colombia). Of a population of 1600 animals slaughtered in a period of two months, 120 were examined. The samples were taken of four different points (hip, skirt, chest and neck), obtaining ten (8.33%) carcasses contaminated with *L. monocytogenes*, demonstrating the high risk of the consumption of contaminated meat for the population. To prevent contamination with *L. monocytogenes* of carcasses destined to human consumption, it is necessary to establish Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) plans at farm level for animals bred for slaughter and, previous to and during the process of sacrifice.

Key words: *Listeria monocytogenes*, slaughter houses, public health, zoonosis, HACCP

INTRODUCCIÓN

El género *Listeria* comprende diferentes especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. murrayi*, *L. seelegeri*, *L. innocua*, *L. grayi* y *L. innocua*. De estas se ha considerado como patógena tanto para los seres humanos como para los animales *L. monocytogenes* (Paillard & Dubois, 2003), bacteria Gram-positiva, aerobia facultativa y que representa un patógeno esencialmente intracelular, el cual es adquirido, principalmente, por la ingestión de alimentos contaminados. Se encuentra ampliamente diseminado en la naturaleza, debido a las características que le confieren una gran capacidad de supervivencia en el ambiente, tales como acidez y altas temperaturas, a diferencia de otros microorganismos más susceptibles a estos factores (Borucki & Peppin, 2003; Moltz & Martin, 2005; Tienungoon *et al.* 2000).

La importancia de la listeriosis en salud pública radica principalmente en la presentación de una forma septicémica que origina abortos y mortalidad neonatal o

el nacimiento de niños con problemas en el sistema nervioso. En adultos inmunodeficientes y en ancianos, el cuadro clínico nervioso puede estar precedido por síntomas gastrointestinales, tales como náusea, vómito, diarrea, fiebre y dolor de cabeza (Crespo *et al.* 1999; Sanchez *et al.* 1992). En rumiantes, la bacteria puede producir, según Gallego *et al.* (2003), Soto & Gallego (2005), Pineda & Mora (2006) y Schweizer *et al.* (2006), meningitis en animales jóvenes y meningoencefalitis en adultos, además de abortos y de septicemia generalizadas, involucrando, en primera instancia, el hígado y otros órganos, como glándula mamaria con la presentación de mastitis (Schweizer *et al.* 2006; Rawool *et al.* 2007).

La transmisión de *L. monocytogenes*, se realiza en forma directa o indirecta a partir de animales portadores, tanto a los seres humanos como a animales. En los humanos, la transmisión se hace principalmente a partir de alimentos contaminados de origen animal, en los cuales, la bacteria se puede multiplicar, incluso en temperaturas de refrigeración (Pinner, 1992; Cocolin & Rantsiou, 2002; Waak *et al.* 2002). Por esta razón, la transmisión de la enfermedad está directamente relacionada con la protección de los alimentos a lo largo de la cadena de producción (Tompkin, 2002).

La carne es uno de los alimentos más importantes para los seres humanos y uno de los más susceptibles de contaminación procedente del contenido gastrointestinal, del tracto respiratorio y de la piel de los animales. Además, existe contagio por el contacto con otras canales infectadas, materiales, utensilios o manipuladores durante el proceso de faenamiento y, posteriormente, durante el transporte y la comercialización (Capita *et al.* 2004). El grado de contaminación de las carnes se incrementa posteriormente, lo cual ha sido reportado por Morales *et al.* (2005) y Jay, (1996) quien encontró que carnes frescas alcanzan a tener menos de 100 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo, mientras que las carnes vendidas en expendios públicos albergan cifras mucho más altas, especialmente la carne de pollo, con niveles de contaminación del 16%, de las muestras analizadas. Estudios realizados por Samelis & Metaxopoulus (1999) mencionan niveles de contaminación en alimentos cárnicos entre el 6,7% y 40%, dependiendo del producto analizado.

Ramirez & Urquijo (2002) realizaron estudios relacionados con la aceptabilidad microbiológica de carnes

procedentes de cinco plantas de sacrificio en la ciudad de Bogotá. De 116 muestras analizadas, el 34% no tuvo la calidad aceptable para el consumo, debido principalmente a la contaminación por coliformes, lo que revela una deficiente manipulación del producto desde el sitio de sacrificio, transporte y expendio. *L. monocytogenes* fue identificada en el 2,5% de las muestras de carne de cerdo examinadas.

La presencia de microorganismos en las plantas de sacrificio, se debe principalmente a la contaminación con la materia fecal de animales portadores sacrificados. El porcentaje de animales, aparentemente sanos, que llegan a la plantas de sacrificio puede estar entre el 11% y 52%, pero se ha comprobado que un 24% de los bovinos pueden albergar contaminantes en los ganglios linfáticos retrofaringeos lo mismo que el 45% de los cerdos sacrificados albergan la bacteria en las tonsilas (Rocourt & Bille, 1997).

Después del sacrificio, se puede presentar contaminación cruzada de los órganos internos del animal con las bacterias de un foco primario; por ejemplo, en la glándula mamaria, en casos de mastitis, esta contaminación es favorecida por el proceso de manipulación durante la evisceración o inspección de carnes. Sin embargo, se han realizado aislamientos a partir de tejidos profundos con superficies previamente estériles, lo cual indica que se pueden deber a infecciones generalizadas con invasión hematogena secundaria (Vishinsky *et al.* 1993).

La *Listeria* puede sobrevivir en varias clases de carne, como por ejemplo, carne molida e hígado, durante su almacenamiento a temperatura de 4-25°C. Factores internos, como composición, pH, humedad y externos, temperatura, atmósfera y flora competitiva, pueden ejercer influencia sobre el desarrollo del microorganismo en las carnes procesadas (Rocourt & Bille, 1997). Los niveles de contaminación, usualmente observados en carne y subproductos son relativamente bajos, aproximadamente el 80-90% de las muestras poseen entre 10-100 ufc/g. (Rocourt & Bille, 1997).

Debido a las altas cifras de sacrificio de ganado de leche, especialmente Holstein, por infertilidad, por mastitis y por edad avanzada y los factores de riesgo para el desarrollo de Listeriosis y a causa de que Díaz & Muñoz (1992) y Muñoz & Díaz (1996) detectaron altos niveles de contaminación en leches y quesos en Bogotá, Gallego

et al. (2003) realizaron estudios con el fin de determinar la presencia de *L. monocytogenes* en un conglomerado lechero de la Sabana de Bogotá, encontrando una prevalencia de *Listeria* spp. del 36%, especialmente en leches. En cambio, Erdogan & Getimkaya (2001), encontraron en Inglaterra cifras de prevalencia del 11,7% en vacas lactantes de raza Holstein sometidas a los mismos factores de riesgo. Para determinar la presencia del microorganismo en canales de animales de la misma raza, Gallego *et al.* (2005) de 1600 canales, examinaron 133 carcasas, encontrando tres de ellas positivas (2,26%) para *L. monocytogenes*, lo cual implicaría la posibilidad de encontrar 216 canales infectadas en un año, con el riesgo para la salud en la población humana consumidora del producto.

La importancia de la ingestión de alimentos contaminados en la presentación de Listeriosis en seres humanos ha sido referida especialmente a partir de los años 80, sobre todo en Escocia, Canadá, California y Suiza (Bell & Kyriakides, 2000; FDA, 2003). En Colombia, entre 1994 y 1998, se registraron 19 casos de la enfermedad por personal médico de la clínica del Valle de Lili (Crespo *et al.* 1999) y Sánchez *et al.* (1992) reportaron la presencia de formas meníngeas aguda supurativa y romboencefálica.

Los estudios de prevalencia de la enfermedad en seres humanos están mejor documentados que en el campo de la salud animal. En Estados Unidos, a pesar de no ser una enfermedad reportable, el Center for Diseases Control (CDC) menciona una rata anual de infección de 7,4 por millón, lo cual puede ser el equivalente a 1850 personas afectadas por la enfermedad cada año y 425 casos fatales. Las ratas de infección son mayores en niños menores de un mes y en adultos mayores de 60 años. Las mujeres en gestación son responsables del 27% de todos los casos y el 60% de los casos entre personas de 10-40 años. Casi el 70% de las infecciones no perinatales se presentan en pacientes con problemas hematológicos, en pacientes con SIDA, con transplantes de órganos y en los pacientes que reciben terapia de corticosteroides (Schuchat *et al.* 1992).

En relación con la frecuencia de portadores de *Listeria* en seres humanos, Schuchat *et al.* (1992), citaron varios autores, quienes estudiaron la presencia de portadores de *Listeria* en diferentes poblaciones. En términos

generales, se registra en materias fecales de empleados de mataderos un 4,8%; pacientes con diarrea 1%; personas en contacto con pacientes con *Listeria* 26%. Otros estudios citados reportan cifras que fluctúan entre el 11 y el 13,3% de aislamientos a partir de materias fecales en diferentes tipos de poblaciones humanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de Estudio y Población: Debido a que no se conoce la prevalencia del microorganismo en ganado de carne, se realizó un estudio de tipo descriptivo experimental de corte transversal, para determinar la presencia de *L. monocytogenes* en canales de bovinos raza Cebú, en una planta de sacrificio de tercer nivel en la Sabana de Bogotá (Colombia). El manejo y análisis de las muestras, se llevó a cabo en el laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Facultad de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana.

De una población de 1600 animales sacrificados durante un período de dos meses, se examinaron muestras tomadas en 120 canales de bovinos raza cebú procedentes de los Llanos Orientales, sin tener en cuenta el sexo o el área de procedencia, con edad aproximada de dos años en promedio. Semanalmente, se tomaron, con el fin de facilitar el trabajo en el laboratorio, muestras de 15 canales hasta completar el número determinado. Para calcular el número de canales y muestras a examinar, se utilizó la ecuación de muestreo aleatorio simple según Scheaffer *et al.* (1987).

Toma de las muestras: El método de toma de muestras fue de tipo no destructivo, según el protocolo de Bravo (2003). Con hisopos de gasa estéril, se frotaron superficies de 10x10cm en áreas de cuatro partes específicas de la canal, las cuales fueron: 1. Cadera: parte posterior del muslo sobre el músculo semitendinoso. 2. Falda: parte ventral del abdomen sobre el músculo recto abdominal. 3. Pecho: parte ventral del tórax sobre los músculos pectorales que rodean al esternón. 4. Cuello: cara lateral dorsal del cuello sobre el músculo trapecio porción cervical.

Análisis Microbiológico: Los hisopos impregnados en las muestras fueron procesadas para el análisis microbiológico, de acuerdo a la metodología descrita en ICONTEC (1999). Inicialmente, se realizó un enrique-

cimiento primario colocando las muestras en 225mL, del medio de enriquecimiento Palcam, incubándolas a 37°C, durante 24 horas.

Partiendo del cultivo de enriquecimiento primario, se tomó una asada y se sembró por agotamiento en agar Palcam. Los cultivos, se incubaron a 35°C, durante 48 horas. La presencia de colonias verde oscuro, enclavadas en el medio, se tomaron como sospechosas de *Listeria* spp. y se repicaron en cajas con medio Trypticase Soy Agar. A estos cultivos, se les realizó coloración de Gram para la confirmación morfológica de *Listeria* spp; luego, se realizaron las pruebas de catalasa, movilidad, CAMP y fermentación de azúcares (D-xilosa, L-ramnosa y D-manitol), específicas para *L. monocytogenes*. Los resultados de estas pruebas, se interpretaron de acuerdo a Blanco & Aranaz (2002).

Análisis estadístico: De las muestras que se establecieron como positivas para *L. monocytogenes*, se determinó un intervalo proporcional, según Daniel (2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La detección e identificación de *L. monocytogenes* ha llamado la atención de diferentes investigadores, debido a la amplia distribución y capacidad que tiene este microorganismo de contaminar los alimentos en diferentes etapas de la cadena de producción (Midelet & Carpentier, 2001).

Los resultados obtenidos a partir de la presente investigación revelan la alta tasa de contaminación en canales de bovinos raza Cebú por *L. monocytogenes*. Esta presencia puede variar, con un rango de probabilidad entre 3,4% y 13,2%. Sobre una muestra total de 120 canales examinadas, 10 (8,3%) resultaron positivas para *L. monocytogenes*, teniendo en cuenta que estos datos fueron estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$), la cantidad de canales que pueden resultar contaminadas de un universo de 1600 animales sacrificados en dos meses sería de aproximadamente 133 carcasas, que pueden ser adquiridas por un número grande de personas, dentro de las cuales puede haber una proporción relativamente alta de personas con factores de riesgo a la enfermedad.

Estudios realizados por Gallego *et al.* (2003) reportaron anteriormente una contaminación del 36% de *Listeria*

spp. en un conglomerado lechero de la Sabana de Bogotá en muestras de leches, hisopados vaginales y materias fecales, lo cual hizo suponer que el microorganismo estuviera involucrado en la contaminación de las canales de estos animales, los cuales son llevados al sacrificio por problemas de infertilidad, edad avanzada y mastitis (Singleton & Dobson, 1995). Al realizar la correspondiente investigación, Gallego *et al.* (2005) encontraron que de un universo de 1600 animales sacrificados en dos meses, examinaron 133 canales, de las cuales tres (2,26%) resultaron positivas para *L. monocytogenes*, lo cual implica, para el mismo período, 36 canales infectadas por este microorganismo, con las consiguientes implicaciones para la salud de los seres humanos, ya que la carne procedente de estos animales por ser de menor valor y comercializada en lugares menos adecuados higiénicamente puede ser adquirida por poblaciones de recursos económicos reducidos, los cuales, a su vez, pueden presentar mayores factores de riesgo de sufrir la enfermedad.

La comprobación de la enfermedad en seres humanos en Colombia por Crespo (1999), en la Fundación Clínica Valle de Lili (FCVL), en Cali (Colombia) y Sánchez *et al.* (1992), en Bogotá corroboran la presencia de la enfermedad en el país y su carácter zoonótico.

L. monocytogenes es considerado un microorganismo zoonótico emergente que actúa como oportunista, afectando personas que tienen disminuida la inmunidad celular, como recién nacidos, mujeres en período de gestación, ancianos y personas que tienen afectado el sistema inmune (Burbano *et al.* 2003; Vásquez *et al.* 2001). La vía más frecuente por la cual el ser humano obtiene la infección es debido al consumo de alimentos contaminados; entre los alimentos de mayor riesgo epidemiológico, según Vanegas *et al.* (2003), se encuentran los productos cárnicos, derivados lácteos, productos marinos, frutas y vegetales.

De acuerdo a Beran (1998), los riesgos para la salud humana originados en los alimentos pueden ser de tipo físico, químico o microbiológico y están clasificados en cuatro categorías, las cuales pueden ser aplicadas a la carne y los derivados cárnicos. Categoría 1: se originan durante la producción de los animales y al controlarlos en las fincas, se evita su presencia en los consumidores. Como riesgos microbiológicos, se encuentran la Brucelosis y la Tuberculosis; químicos, como medicamentos

y físicos, como fragmentos de huesos. Categoría 2: principalmente son de tipo microbiológico, se originan durante la producción y pueden originar contaminación cruzada durante el procesamiento y multiplicarse en o sobre los tejidos. Si se reducen a los mínimos niveles durante la producción pueden a su vez ser reducidos a los mínimos niveles durante la faena de sacrificio, prevenirse su diseminación en la carne y reducirse al máximo en el plato del consumidor. Dentro de éstos, se encuentran la mayoría de los contaminantes de los alimentos, como la Salmonelosis, la Colibacilosis y la Campilobacteriosis. Categoría 3: incluyen prácticamente todos los organismos ambientales que pueden infectar a los animales durante la etapa de producción, contaminar los alimentos u originar la producción de toxinas en los mismos. El método más efectivo de controlarlos se aplica durante el proceso del faenamiento y manejo posterior de las carnes. En este grupo se encuentra la *L. monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum* y *Bacillus cereus*. Categoría 4: son riesgos microbiológicos que producen infecciones en humanos y pueden ser transferidos a los alimentos por manejo inadecuado. En esta categoría, se encuentra el *Staphylococcus aureus* y el *Enterococcus* spp. de origen humano.

El proceso de contaminación con *L. monocytogenes* puede empezar durante la crianza de los animales destinados al sacrificio. Esta contaminación, se origina debido principalmente a la ingestión de microorganismos presentes en las aguas, pastos y en muchos casos a la ingestión de ensilajes, los cuales, en temperaturas frías con altos porcentajes de humedad y de contenido alto de azúcar presentan una fermentación más pobre y lenta que permite mejores condiciones para la multiplicación de *L. monocytogenes* que en medios más calurosos (Gudmundsdottir *et al.* 2004). La bacteria, una vez ingerida, pasa por vía sanguínea a las diferentes vísceras incluso el sistema nervioso donde puede llegar a producir diferentes cuadros patológicos especialmente en animales que presenten inmunodeficiencias por enfermedades subyacentes.

Fernández & Quiñónez (2003) concluyeron que el diseño del sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP) durante la crianza y finalización de los animales destinados al sacrificio representa un componente importante de aseguramiento de la calidad e inocuidad de la carne y, por consiguiente, de la protección de la salud de los consumidores. Para lograr la

implementación del sistema HACCP en las fincas de producción es necesario contar, además, con prerequisites, como la Estandarización de Operaciones (EO), las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), como programas de limpieza y de desinfección y control de artrópodos y roedores y las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), tales como el adecuado uso de plaguicidas y medicamentos veterinarios. La etapa de cuarentena previa al embarque de los animales, constituye el único PCC de la etapa de prebeneficio debido a su importancia para prevenir el ingreso de los animales a etapas siguientes con enfermedades adquiridas anteriormente; sin embargo, la contaminación con *L. monocytogenes*, al ser considerado un contaminante ambiental y residente a nivel del tracto gastrointestinal, es prácticamente imposible evitarla a menos que se implementen planes de BPM, BPA y EO, durante todas las etapas de producción de la carne; estando entre las más importantes las relacionadas con el manejo del ganado previo a la faena de sacrificio, como es el transporte a las plantas, el periodo de reposo en los corrales y la conducción al cajón de insensibilización o noqueo. Durante estas etapas, uno de los problemas que puede ocasionar la contaminación de la carne con *L. monocytogenes* y/u otros microorganismos es el estrés sufrido por los animales.

De acuerdo a Castro & Robaina (2003) hay que tener en cuenta tanto las actividades previas al embarque como las que se realizan más atrás en el tiempo. Estas últimas, en algunos casos, provocarán daños que solamente podrán ser detectadas post-mortem. La carne que se consume es el producto de una serie de cambios bioquímicos, biofísicos y enzimáticos que se inician en el músculo a partir del sacrificio del animal. Para que este proceso sea adecuado es necesario contar con determinadas condiciones fisiológicas sin las cuales la evolución post-mortem no se desarrollará correctamente. Si estas condiciones no son las apropiadas, se afectará la calidad en su presentación y su preservación, ya sea sus características sensoriales, las vinculadas a los procesos de elaboración de productos cárnicos y aquellas que pueden incidir en la conservación del producto, como el pH, creando un ambiente favorable al desarrollo microbiano.

En los animales normales existe un equilibrio interno que es afectado ante determinados estímulos del medio (desde sacarlos del ambiente al que están habituados y cambio de compañeros hasta ayunos excesivos y malos

tratos). En su medio, la mayoría de los animales logran recuperar dicho equilibrio si los estímulos no son graves; de lo contrario, se activa un sistema de liberación de adrenalina y corticosteroides que aumenta sus niveles sanguíneos. Estas sustancias desencadenan una serie de respuestas en el animal, que implican la utilización de glucógeno muscular (reserva energética), para liberar energía rápidamente.

Agotado el glucógeno muscular, el proceso de evolución post-mortem se ve alterado comprometiendo el grado de acidez (pH elevado) creando así las condiciones para la aparición del fenómeno de "corte oscuro", conocido como DFD (Dark-Firm-Dry: oscuro, firme seco), con una glicólisis post-mortem poco intensa, disminución del contenido de ácido láctico, pH final elevado y aumento de retención de agua (Castro & Robaina, 2003). Al incrementarse el pH de la carne, los microorganismos, como la *L. monocytogenes* u otras bacterias encuentran un medio favorable para su multiplicación y su posterior paso a los seres humanos.

De lo anterior, se puede deducir que el control de la contaminación bacteriana de la carne post-mortem comienza durante la crianza de los animales, continúan durante las etapas previas al sacrificio y lógicamente durante todo el proceso de faenamiento de los animales en la planta de sacrificio.

Barros & Castro (2004) y Castro & Robaina (2003) del Instituto Nacional de Carnes del Uruguay recopilaron las prácticas de operación conducentes a asegurar el bienestar animal durante las etapas anteriores al proceso de faenamiento de las reses, con el fin de evitar al máximo el estrés de los animales y, por consiguiente, la contaminación post-mortem con diferentes microorganismos, como la *L. monocytogenes*.

El sistema HACCP es una estrategia que se fundamenta en el aseguramiento de la calidad y principalmente de la inocuidad de la carne, dirigida hacia todos los factores de contaminación, supervivencia, crecimiento de microorganismos, además de los peligros químicos y físicos. Adicionalmente es necesario contar con el diseño de documentación e implementación de prerequisites, como las EO, las BPA y las BPM, que deben incluir los planes y los programas de saneamiento y de capacitación (Fernández & Quiñones, 2003).

CONCLUSIONES

En el presente estudio, se pone en evidencia el alto grado de contaminación con *L. monocytogenes* que pueden tener las canales de ganado Cebú. Estos resultados son altamente significativos desde el punto de vista de la Salud Pública debido a que la carne es un alimento de alto consumo. Esta contaminación puede ocasionar listeriosis en niños, mujeres embarazadas, ancianos y personas inmunodeprimidas por enfermedades concomitantes.

Con el fin de reducir a niveles mínimos la contaminación por *L. monocytogenes* en la carne es necesario implementar planes de BPM, EO y HACCP en las fincas de crianza de los animales destinados al sacrificio; durante las etapas previas al sacrificio; a lo largo del proceso de faenado de los animales y durante la comercialización y consumo de la carne.

BIBLIOGRAFÍA

- BARROS, A.; CASTRO, L. 2004 Bienestar animal. Buenas prácticas operacionales. Instituto Nacional de Carnes. (Uruguay). Serie Técnica N°34, p.63.
- BELL, C.; KYRIAKIDES, A. 2000. *Listeria*: Una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. Edit. Acribia. España. 172p.
- BERAN, G.W. 1998. Sinopsis of the postharvest food safety symposium. J. Am. Vet. Med. Assoc. (USA). 213(12):1750-1751.
- BLANCO, M.; ARANAZ, A. 2002 Género *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Renibacterium* y *Lactobacillus*. En: Manual de Microbiología Veterinaria. Eds. Vadillo, S.; Píriz, S.; Mateos, E. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid. 1ª Ed. p.477-489
- BORUCKI, M.; PEPPIN, J. 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. (USA). 69(12):7336-7342.
- BRAVO A. 2003. Manual de procedimientos de monitoreo microbiológico oficial en mataderos de exportación. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Primera edición Santiago, Chile. 58p.
- BURBANO, E.; CARRASCAL, K.; MERCADO, M.; POUITOU, R. 2003. Validación de PCR para *Listeria monocytogenes* en leches. Normas y Calidad. 18(57):39-47.
- CAPITA, R.; PRIETO, M.; ALONSO, C. 2004. Sampling methods for microbiological analysis of red meat and poultry carcasses. J. Food Microbiol. (USA). 67(6):1303-1308.
- CASTRO, D.L.E.; ROBAINA, P.R.M. 2003. Manejo del ganado previo a la faena y su relación con la calidad de la carne. (Uruguay). Serie de Divulgación N°1. 31p.
- COCOLIN, L.; RANTSIOU, K. 2002. Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. Appl. Environ. Microbiol. 68(12):6273-6282.
- CRESPO, M.; VÉLEZ, J.; CASTAÑEDA, C.; HOYOS, F.; LÓPEZ, M.; SALAZAR, J. 1999. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en un hospital de tercer nivel. Colombia Médica. 30(2):89-98.
- DANIEL, W.W. 2002. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4º Ed. Editorial Limusa S.A. de c.v. Méjico. 755p.
- DÍAZ, G.; MUÑOZ, A.I. 1992 Incidencia de *Listeria monocytogenes* en leches crudas y leches pasteurizadas en el altiplano Cundiboyacense. Biomédica. (Colombia) 14(1):58
- ERDOGAN, H.; GETIMKAYA, L. 2001. Prevalence, incidence, signs and treatment of clinical Listeriosis in dairy cattle in England. Vet. Rec. (Inglaterra). 149:289-293.
- FEDERAL DRUG ADMINISTRATION (F.D.A.). 2003. *Listeria monocytogenes*. Risk assessment. Questions and Answers. FDA News. (USA). 4p.
- FERNÁNDEZ, J.A.; QUIÑONEZ, J. de J. 2003 Diseño del sistema HACCP para el proceso de producción de carne bovina para el consumo. Rev. Col. Cienc. Pec. 16(1):46-62

- GALLEGO, M.; TORRES, O; SOTO, Y.; DUQUE, D.C.; BENITEZ, C. 2003. Determinación de portadores de *Listeria* spp. en un conglomerado lechero de la vereda Puente de Piedra del municipio de Madrid (Cundinamarca, Colombia) Rev. U.D.C.A Actual. & Divul. Cient. (Colombia). 6(1):49-56.
- GALLEGO, M.; MANRIQUE, P.C.; TORRES, O.A.; RAMÍREZ, M.F. 2005. *Listeria monocytogenes* en canales de ganado Holstein en una planta de sacrificio de la Sabana de Bogotá (Colombia). Rev. U.D.C.A Actual. & Divul. Cient. 8(2):95-101.
- GUDMUNDSTTOIR, K.B.; SVANSSON, V.; AALBAEK, B.; GUNNARSSON, E.; SIGURDARSON, S. 2004. *Listeria monocytogenes* in horses in Iceland. Vet. Rec. 155:456-459.
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS (ICONTEC). 1999. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la detección de *Listeria monocytogenes*. Parte 1. Método de detección. Norma Técnica Colombiana 4666.
- JAY, J.M. 1996. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. Food Control (Inglaterra). 7(415):209-214.
- MIDELET, G.; CARPENTIER, B. 2001. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. Appl. Environ. Microbiol. 68(8):4015-2024.
- MOLTZ, A.; MARTIN, S. 2005 Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. J. Food Prot. (USA) 68(1):92-97.
- MORALES, A.; BARBOSA, B.; ZAMORA, M. 2005. Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en chorizos en expendios de Guadalajara y Zapopan. Departamento de Salud Pública. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara, México. 4p.
- MUÑOZ, A.; DÍAZ, G. 1996 Determinación e identificación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y madurados que se comercializan en Santafé de Bogotá. Notinvima. 1:19-21.
- PAILLARD, D.; DUBOIS, V. 2003. Rapid identification of *Listeria* species by using restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 23 rRNA gene fragments. Appl. Environ. Microbiol. 69(11):6386-6392.
- PINEDA, Y; MORA, Y. 2006. Listeriosis. Revista Digital de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela. CENIAP HOY N° 11 Mayo-Agosto 2006. Maracay Aragua Venezuela.
- PINNER, R.W. 1992. Role of foods in sporadic Listeriosis. II. Microbiological and epidemiological investigations. J. Am. Med. Assoc. 267:2046-2050.
- RAMÍREZ, L.; URQUIJO, G. 2002. Inspección, vigilancia y control de las carnes de bovinos y porcinos en Bogotá D.C. Boletín Epidemiológico Distrital. 7(5):2-11.
- RAWOOL, D.B.; MALIK, S.V.; SHAKUNTALA, I.; SAHARE, A.M.; BARBUDDHE, S.B. 2007 Detection of multiple virulence genes associated in *Listeria monocytogenes* isolated from bovine mastitis cases. Internal J. Food Microbiol. (USA) 113(2):201-207
- ROCOURT, J.; BILLE, J. 1997. Foodborne Listeriosis. World Health Statistics Quaterly. (USA) 50:67-71
- SAMELIS, J.; METAXOPOULUS, J. 1999. Incidence and principal sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. Food Microbiol. (USA). 16:465-477.
- SÁNCHEZ, E; PARDO, R.; DUQUE, A.; PALOMINO, S.; REYES, E. 1992. Listeriosis del sistema nervioso central. Formas meníngea aguda supurativa y romboencefálica. Acta Neurol. Col. 8(3):165-168.
- SCHEAFFER, R.; MENDEN, H.; LIMAN. O. 1987. Elementos de muestreo y selección de tamaño de muestras para la estimación de las medias y totales poblacionales. Grupo Editorial Iberoamericano. México, 58p.

- SCHUCHAT, A.; DEEVER, K.A.; WENGER, J.D.; PLIKAYTIS, J.D.; MASCOLA, L.; PINNER, R.; REINGOLD, A.L.; BROOME, C.V. 1992 Role of foods in sporadic Listeriosis. I. Case. Control study of dietary risk factors. J. Am. Med. Assoc. 267(15):2041-2045.
- SCHWEIZER, G.; EHRENSPERGER, F.; TORGERSON, P.R.; BRAUN, U. 2006. Clinical findings and treatment of 94 cattle presumptively diagnosed with mastitis. Vet. Rec. (Inglaterra) 158(17):588-592
- SINGLETON, G.H.; DOBSON, H. 1995. A survey of the reasons for culling pregnant cows. Vet. Rec. 136(2):162-165.
- SOTO, Y.; GALLEGO, M. 2005. Importancia de la listeriosis en Salud Pública. Asociación Colombiana de Criadores de Ganado Cebú. Rev. El Cebú. 343:66-75.
- TIENUNGOON, S.; RATKOWSKY, D.; McMEEKIN, T.; ROSS, T. 2000. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl and lactic acid. Appl. Environ. Microbiol. 66(4):709-725.
- TOMPKIN, R. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. J. Food Prot. 65(4):709-725.
- VANEGAS, L.; ROJAS, G.; VERGARA, R. 2003. Detección de *Listeria monocytogenes* de diferentes orígenes. Mundo Microbiol. 2(3):17-20.
- VÁZQUEZ, J.; KUPW, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T. 2001 *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Rev. (USA). 14(3):584-640.
- VISHINSKY, Y.; GRINBERG, A.; OZERY, R. 1993. *Listeria monocytogenes* udder infection and carcass contamination. Vet. Rec. 6:484
- WAAK, E.; THAM, W.; THAM, M. 2002. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. Appl. Environ. Microbiol. 8(7):3366-3370.

Recibido: Febrero 22 de 2007

Aceptado: Mayo 2 de 2007

TRABAJO PILOTO EN CONEJOS INDUCIENDO EL SÍNDROME ISQUEMIA/REPERFUSIÓN PARA EL ENSAYO DE DOS PROTOCOLOS TERAPEÚTICOS

PILOT WORK ON RABBITS INDUCING ISCHEMIA/ REPERFUSION TO TEST TWO THERAPEUTIC PROTOCOLS

José Ramón Martínez Aranzales ¹
Piedad Cristina Rivas López ²

RESUMEN

Con el fin de establecer parámetros comparativos sobre el efecto de dos alternativas terapéuticas para el tratamiento del síndrome isquemia y reperfusión en medicina veterinaria, 30 conejos de la raza Nueva Zelanda, de aproximadamente 300 g. de peso, fueron sometidos a isquemia mediante clampeo de dos segmentos del intestino delgado (yeyuno), uno comprometiendo el riego venoso y otro con compromiso arterio-venoso. Después de una hora de isquemia, se aplicaron los tratamientos en prueba, ozono y glucosa+insulina+potasio (GIP), dejando un grupo control sin tratar, para luego permitir el reestablecimiento del flujo sanguíneo dos horas después de la isquemia. Se tomaron muestras de los segmentos intestinales de cada grupo antes de la isquemia, y después de una y dos horas del periodo isquémico y una hora del periodo de reperfusión. Para valorar lesiones post-reperfusión a las 12 horas, se practicó eutanasia a todos los animales y se tomaron muestras del intestino manipulado. Se empleó un análisis estadístico descriptivo y una prueba basada en rachas (Wald-Wolfowitz)

debido a que la variable respuesta no es continua. Se encontró daño epitelial e inflamación transmural en los intestinos muestreados de mayor intensidad en aquellas en las que el tiempo de isquemia aumentó y mayor en las que no tuvieron tratamiento, encontrándose diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Palabras clave: isquemia, reperfusión, conejos, ozono, GIP.

SUMMARY

In order to establish comparative parameters of the effect of two alternative therapies for the treatment of the ischemia and reperfusion syndrome in veterinary medicine, 30 New Zealand rabbits were subjected to ischemia by clamping of two segments of the small intestine, one affecting the venous irrigation and the other one with arterial-venous compromise. After one hour of ischemia two treatments were tested, ozone and glucose + insulin + potassium (GIP), the control group was not treated. The reestablishment of the circulatory flow was permitted two hours after the ischemia. Samples of the intestinal segments were taken before and one and two hours after the ischemia and one hour after the reperfusion period. To evaluate injuries at 12h post – reperfusion, euthanasia of all animals was practiced and samples of the manipulated intestine taken. A descriptive statistic

¹ M.V.Z., M.Sc., Universidad del Tolima.
jrramonmartinez@yahoo.com

² M.V., M.Sc., Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A CI 222 No. 55-37, Bogotá D.C.
privas@udca.edu.co

analysis and a test based on aleatory (Wald – Wolfowitz) was used, since the variable response is not continuous. Epithelial damage and transmural inflammation of the intestine sampled was found, with higher intensity of those samples with longer ischemia time and higher in those with no treatment, showing significant differences ($p \leq 0.05$).

Key words: ischemia, reperfusion, rabbits, ozone, GIP.

INTRODUCCIÓN

Actualmente en medicina, el síndrome de isquemia/reperusión (I/R) es considerado como el fenómeno responsable de la disfunción orgánica que se observa en pacientes que han recibido lesiones mayores (Moore *et al.* 1995). La falla multiorgánica (síndrome de disfunción orgánica múltiple, (S.D.O.M.), es la principal causa de muerte de los pacientes críticos; por eso, se hace necesario la investigación de nuevos protocolos terapéuticos bajo la óptica de limitar el tiempo isquémico, preservar las reservas de ATP y mantener la integridad estructural (Raffan & Klin, 2000).

En medicina veterinaria, las investigaciones en I/R han sido concentradas en el campo de la gastroenterología equina, donde los disturbios acompañados de isquemia poseen gran importancia debido a su elevada ocurrencia, aunque todos los pacientes animales son susceptibles a presentarla (Tello & Torres, 2001). En este sentido, las lesiones de reperusión tiene una gran importancia, principalmente en las afecciones intestinales estrangulantes y tromboembólicas, así como también en otras situaciones clínicas como el shock hipovolémico, torsiones gástricas y uterinas, trombosis vascular, infecciones miocárdicas, lesiones musculares y, en procedimientos quirúrgicos, de menor y alto nivel, como en el transplante de órganos, injertos de piel y torniquetes (Vatistas *et al.* 1996).

Dada la complejidad del evento clínico; existen actualmente esfuerzos para clarificar y dilucidar detalles relacionados con la fisiopatología y, por ende, sobre aspectos terapéuticos tanto en medicina como en medicina veterinaria (Vinay *et al.* 2004).

El estudio de estas lesiones en conejos, como biomodelos es importante pues los resultados obtenidos pueden

servir para posteriores estudios en equinos, de manera que aporten al manejo terapéutico del síndrome; pues a pesar de los recientes avances en el tratamiento y en la clínica quirúrgica, la mortalidad en equinos que presentan el síndrome no ha sido controlada, sin encontrarse disponible, hasta el momento, una terapia eficiente para el tratamiento de la lesión de reperusión en la rutina clínica del abdomen agudo en equinos (Dabareiner *et al.* 1998).

El presente trabajo pretendió evaluar la eficacia de dos protocolos terapéuticos en la prevención y la disminución de lesiones por isquemia y reperusión en segmentos intestinales de conejos a través de escalas de gravedad y descripciones histomorfológicas de las alteraciones, en modelos experimentales venosos y arteriovenosos, buscando ofrecer alternativas en el manejo del síndrome en equinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 30 conejos, de la raza Nueva Zelanda, aproximadamente de 300g de peso, distribuidos en tres grupos de 10 conejos cada uno: Grupo 1: tratados con ozono, vía endovenosa, mezcla de ozono, diluido en 30mL. de solución salina isotónica (NaCl 0.9%) (Alves, 2004); grupo 2: tratados con una mezcla de insulina (10UI), potasio (3,6mL de KOH) y glucosa (30mL de dextrosa) (GIP) (Angelos *et al.* 2002) y grupo 3: no tratados o grupo control. Los animales fueron sometidos a sedación con acepromacina (0,5mg/kg) y xilacine (1mg/kg), como preanestésico y anestesia general con ketamina (2,2-2,4mg/kg I.V.). Luego, se procedió al acto quirúrgico para la obtención de isquemia mediante clampeo de tres segmentos del intestino delgado (ye-yuno); uno comprometiendo el riego venoso, otro con compromiso arterio-venoso y un tercero, tomado como segmento control.

Después de una hora de isquemia, se tomaron muestras de intestino cerca al lugar en donde la isquemia había interrumpido el flujo arterio-venoso y otra más cerca al lugar en donde sólo se había interrumpido el flujo venoso. La isquemia, se mantuvo por una hora más, luego de lo cual se procedió a tomar dos muestras más ubicadas en sitios cercanos de las primeras. Faltando cinco minutos para cumplir la última hora de isquemia, se administraron los tratamientos en prueba (ozono y

GIP). Luego de esto, se procedió a eliminar el clampeo y, después, se tomaron dos muestras ubicadas de igual forma que las anteriores. Todas las muestras fueron marcadas y conservadas en formol tamponado al 10% por 48 horas para someterlas a su posterior imbibición en bloques de parafina y la posterior obtención de láminas coloreadas con Hematoxilina y Eosina. Finalizados los tiempos seleccionados a evaluar y tomadas las muestras, se realizó la síntesis de la cavidad abdominal y posterior recuperación anestésica. Doce horas después de finalizada la intervención quirúrgica, los animales fueron sacrificados mediante la técnica de dislocación atlanto-occipital y sometidos a necropsia, en la cual se procedió a tomar dos muestras finales de intestino en zonas similares a las contempladas durante la cirugía, este protocolo se basó en el realizado por Faleiros (1997), en equinos.

Evaluación microscópica: Las láminas se evaluaron histomorfológicamente, describiendo las lesiones según los grados de extensión y de gravedad, según la escala descrita por Stallion *et al.* (2005). Los datos obtenidos en esta evaluación fueron consignados en una tabla diseñada para tal fin y sometidos a un análisis descriptivo con relación a la frecuencia de las lesiones dentro los grados de gravedad establecidos para cada grupo experimental. Análisis no paramétricos de comparación de efecto de tratamiento sobre la gravedad de las lesiones, a través de una prueba basada en rachas (Wald-Wolfowitz) (debido a que la variable respuesta no es continua), para ello se utilizó un paquete estadístico computarizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al provocar la interrupción del flujo vascular intestinal, se pudo observar que todos los grupos estudiados mostraron cambios drásticos en los tejidos intestinales ($p \geq 0.05$), acompañados siempre de reacción inflamatoria de variable intensidad (figura 1); estos cambios demuestran la severidad de las lesiones ocasionadas tanto por la interrupción del flujo sanguíneo como por la liberación de factores injuriantes durante la reperfusión, ya que como otros autores lo reportan, la falta de oxígeno es más severa en la mucosa intestinal y el signo temprano de la injuria isquémica es la descamación de la línea epitelial (Chiu *et al.* 1970; Haglund & Bergquist, 1999).

Al estudiar las lesiones intestinales de los animales ubicados en los diferentes grupos experimentales, se notó que durante la isquemia arteriovenosa y venosa de duración una hora, así como durante la isquemia arteriovenosa y venosa de duración dos horas, las lesiones no presentaron diferencias significativas entre los grupos ($p \leq 0.05$), lo cual es de esperar, pues los protocolos terapéuticos sólo fueron administrados luego de las dos horas de isquemia y, por lo tanto, no tendría que presentarse diferencia alguna entre las unidades experimentales (figura 2), pues cuando se provoca la hipoperfusión que conlleva a la injuria isquémica sobre los enterocitos y sus estructuras de sostén, lo que resulta es daño de

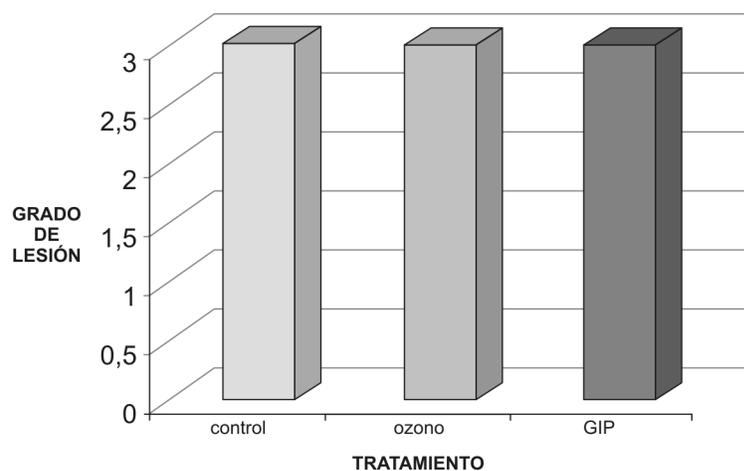


Figura 1. Grado de lesión en el intestino de conejos sometidos a isquemia durante una hora.

la mucosa y de las células epiteliales, acompañado de pérdida de las microvellosidades intestinales, así como de su función absortiva; además, ocurre apoptosis en estas células permitiendo la pérdida de la integridad de la membrana basal y, por tanto, pérdida de la función de defensa del intestino, lo cual podría permitir proliferación bacteriana y producción local de citocinas (Grotz *et al.* 1995; Ohri, 1996; Deitch & Goodman, 1999). El

daño intestinal varía dependiendo de la severidad de la injuria isquémica en la mucosa; así, la interrupción de la protección del epitelio, es un portal potencial para la entrada de bacterias y sus productos en la circulación sistémica. Esta pérdida de la integridad de las células epiteliales puede muy bien ser la promotora del proceso de inflamación sistémica (Stallion *et al.* 2004).

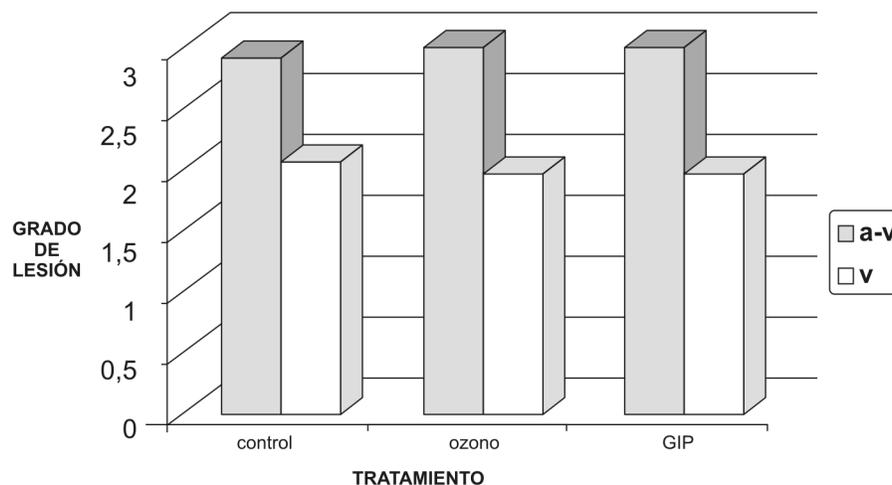


Figura 2. Comparación entre las lesiones ocasionadas por períodos isquémicos arteriovenosos (a-v) y venosos (v), en conejos durante una hora.

Durante la reperfusión arteriovenosa y venosa (post-tratamiento), las lesiones ocurridas tanto en las muestras tomadas cerca de la isquemia arteriovenosa como las cercanas a la isquemia venosa, fueron muy similares a las observadas en las anteriores muestras, luego de aplicado el tratamiento en todos los grupos a estudiar (figura 3).

Durante la reperfusión ocurre la producción de especies reactivas al oxígeno, las cuales causan fuertes daños en la mucosa y en las vellosidades (Yasim, 1996). Es por esto que en todos los animales incluidos en este estudio al realizar las necropsias, se observaron cambios inflamatorios que, según el tratamiento utilizado, variaron en intensidad ($p \leq 0,05$).

Este daño resulta en una injuria tanto macroscópica como microscópica que podría estar relacionada directamente con la supervivencia. Como se esperaba, en este trabajo, cuando el suplemento vascular del intestino se interrumpió, se indujo un alto grado de injuria intestinal.

Además, la evaluación histológica mostró que luego de la isquemia, en todos los casos, se presentó la inflamación y áreas visibles de daño epitelial, tal y como lo reportan Stallion *et al.* (2005).

Las lesiones encontradas después de la reperfusión en todos los animales de los diferentes grupos experimentales tanto en las muestras tomadas durante la cirugía como durante la necropsia, doce horas después, evidenciaron inflamación acompañada de zonas necróticas, y al estudiar las muestras tomadas durante la necropsia a los animales del grupo control, se observó mayor severidad de las lesiones; estas lesiones se originaron, debido a que con la reperfusión del intestino isquémico, los productos del prolongado metabolismo anaeróbico se liberan, contribuyendo posiblemente a la subsecuente inflamación local y sistémica que es proporcional al grado de isquemia. Estos resultados en la hipoperfusión intestinal continua, incrementa el daño local y amplifica la inflamación sistémica (Stallion *et al.* 2004).

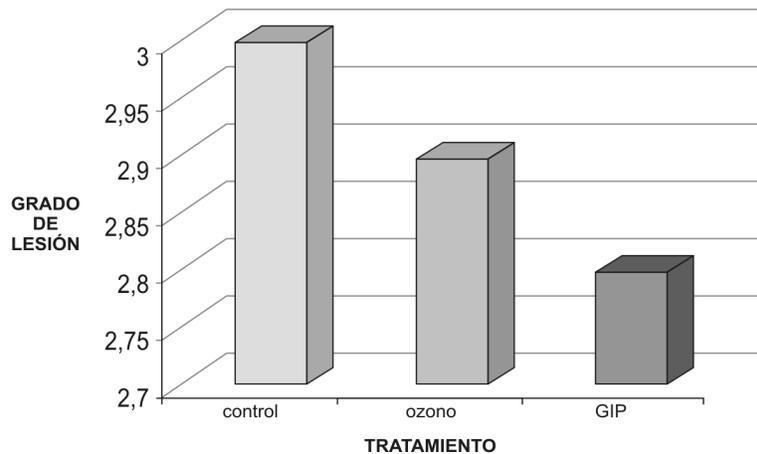


Figura 3. Grado de lesión ocurrida en el intestino de conejos, tratados con dos alternativas terapéuticas, durante el período de reperfusión.

Si el flujo sanguíneo y de oxígeno retorna a los tejidos antes de la muerte celular ocurren severos eventos bioquímicos inmediatamente durante la reperfusión. La injuria resultante es llamada injuria de reperfusión y puede ser iniciada por severos mecanismos que crean una respuesta inflamatoria. Así la injuria por reperfusión, se observa más comúnmente después de isquemia parcial o total (Stallion *et al.* 2002; Park *et al.* 1990), como se observó en este estudio, en donde las lesiones post-reperfusión en el grupo control, mostraron mayor severidad que aquellas de los grupos tratados (figura 4).

Muchos estudios han documentado injurias significativas después de la reperfusión del intestino delgado en caballos y otros animales (Gianotti *et al.* 1994; Park *et al.* 1990; Jarrar *et al.* 1999). Sin embargo, algunos estudios no han demostrado fuerte deterioro de la función celular después de la reperfusión del colon en los equinos (Reeves *et al.* 1990), pero, por lo menos en las condiciones de este estudio, las lesiones después de la reperfusión fueron significativamente más severas que las observadas durante la isquemia, al parecer por los eventos bioquímicos involucrados, que se han reportado con anterioridad (Stallion *et al.* 2002).

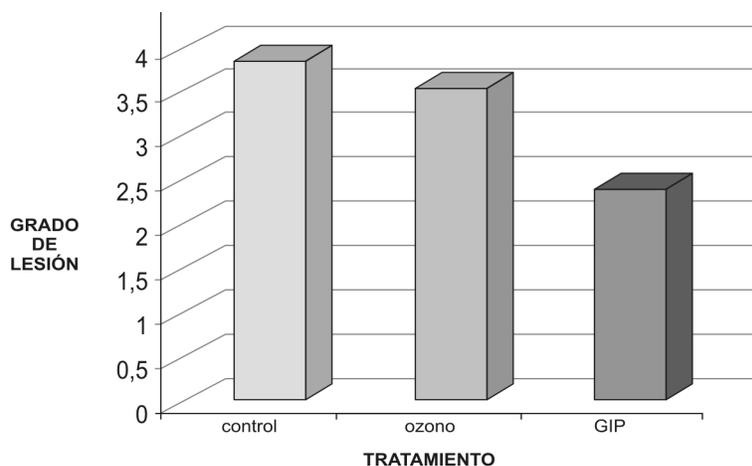


Figura 4. Grado de lesión encontrada en el intestino de conejos tratados con dos protocolos y un control, luego de doce horas.

Investigaciones acerca de la patogenia y respuesta al tratamiento para la injuria por reperfusión sugieren que la intervención terapéutica puede ser benéfica (Abbas *et al.* 2000). En este trabajo se encontró que las muestras obtenidas de animales tratados con GIP, luego de doce horas de transcurrida la reperfusión, mostraron una reducción significativa en las lesiones del tejido intestinal al compararlas con los cortes de intestinos tomados de animales tratados con ozono o no tratados. La reparación del epitelio intestinal comienza muy pronto, luego de ocurrida la injuria, por la vía de la restitución, un proceso que depende de la migración de las células epiteliales del intestino, que rodean el área denudada, de manera que pueden cubrirla y así repararla. Una injuria profunda puede repararse por medio de la proliferación de células epiteliales de las criptas, la cual antecede a la migración de éstas hacia la zona denudada. Este proceso está mediado por una compleja interacción entre hormonas, factores de crecimiento y citocinas (Fukai *et al.* 2005). En este proceso interviene el factor de crecimiento epidermal, unido a la heparina (HB-EGF), que es una glicoproteína miembro de la familia EGF que fue aislada inicialmente de un cultivo de macrófagos humanos y ha demostrado ser un potente agente citoprotector (De Maio *et al.* 1998). Igual que los otros miembros de esta familia, este factor actúa uniéndose al receptor de membrana de su célula blanco. El HB-EGF, al igual que el EGF, induce la proliferación y la migración celular, además es mitogénico en las células musculares, fibroblastos y en las células epiteliales (De Maio *et al.* 1998; Trentzsch *et al.* 2003). Estas propiedades se demostraron por medio de estudios *in Vitro*, en los que pudo observarse la acción protectora sobre las células epiteliales expuestas a la hipoxia (Trentzsch *et al.* 2003).

Además, se ha demostrado que HB-EGF disminuye la producción de niveles nocivos de óxido nítrico (NO) y de la óxido nítrico sintasa, en su forma inducible (iNOS), en las células epiteliales del intestino expuestas a las citocinas proinflamatorias (Shenkar & Abraham, 1993). El HB-EGF también disminuye la producción del dañino peroxinitrito (ONOO-) después del síndrome I/R *in vivo*. Esta acciones juntas sugieren que el tratamiento con GIP podría acelerar la aparición del HB-EGF, el cual podría estar ayudando a recuperar los daños ocasionados por I/R (Balk, 2000).

Estos hallazgos indican si la lesión intestinal, a causa de la injuria progresiva permanece, existencia de lesiones

severas que podrían comprometer la vida del paciente. Pero nuestros conocimientos son limitados en cuanto al papel directo o indirecto de la injuria intestinal en la iniciación de la inflamación sistémica, así como en cuanto a la identificación de aquellas citocinas involucradas en la cascada sistémica responsable de la falla multisistémica y de la muerte que plantean Stallion *et al.* (2005); además, nos falta por comprobar a cabalidad la efectividad de los tratamientos recomendados, pues los animales tratados con ozono, aunque mostraron leve disminución de las lesiones intestinales, no mostraron diferencias significativas al compararlos con los del grupo control. De igual forma, falta por saber si estos tratamientos pueden tener efectos colaterales indeseados en otros órganos como hígado, corazón, pulmón o riñón, pues éstos se ven seriamente involucrados en los proceso de reperfusión post-isquémica y podrían afectarse como resultado de la terapéutica.

CONCLUSIONES

La falta de oxígeno es más severa en la mucosa y el signo temprano de la injuria isquémica es la descamación de la línea epitelial. Cuando el suplemento vascular del intestino se interrumpió, se indujo un alto grado de injuria intestinal. Además, la evaluación histológica mostró que luego de la isquemia, en todos los casos, se presentó la inflamación y áreas visibles de daño epitelial

Durante la reperfusión, ocurre la producción de especies reactivas al oxígeno, las cuales causan fuertes daños en la mucosa y vellosidades, pues con la reperfusión del intestino isquémico, los productos del metabolismo anaeróbico se liberan, contribuyendo posiblemente a la inflamación local y sistémica que es proporcional al grado de isquemia. Estos resultados en la hipoperfusión intestinal continua incrementa el daño local y amplifica la inflamación sistémica.

El daño intestinal varió dependiendo de la severidad de la injuria isquémica en la mucosa. Así, la interrupción de la protección del epitelio, puede predisponer la entrada de bacterias y sus productos en la circulación sistémica y originar lesiones de mayor severidad. Esta pérdida de la integridad de las células epiteliales puede muy bien ser la promotora del proceso de inflamación sistémica (Valiente *et al.* 2000).

Los conocimientos son limitados en cuanto al papel directo o indirecto de la injuria intestinal en la iniciación de la inflamación sistémica. Así mismo, en cuanto a la identificación de aquellas citocinas involucradas en la cascada sistémica responsable de la falla multisistémica. Hace falta conocer también aquellos factores que, como el HB-EGF induce la proliferación y la migración celular. Además, es mitogénico en las células musculares, fibroblastos y en las células epiteliales y podría estar ayudando a recuperar los daños ocasionados por I/R; por lo tanto, la utilización de este factor podría constituir una alternativa terapéutica futura.

BIBLIOGRAFÍA

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; POBE, J. 2000. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: WB Saunders Co. p.345-387.
- ALVES, G.E.S.; ABREU, J.M.G.; FILHO RIBEIRO, J.D.; MUZZI, L.A.L.; OLIVEIRA, H.P.; TANNUS, R.J.; BUCHANAN. 2004. Efeitos do ozônio nas lesões de reperfusão do jejuno em eqüinos. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 56 (4):433-437.
- ANGELOS, M.G.; MURRIA HOLT, N.; GORSLINE, R.T.; KLAWITTER P.F. 2002. Glucose, insulin and potassium (GIK) during reperfusion mediates improved myocardial bioenergetics. Resuscitation (USA) 55(12):329-336.
- BALK, R. 2000. Pathogenesis and management of multiple organ dysfunction or failure in severe sepsis and septic shock. Crit. Care. Clin. (USA).16:337-352.
- CHIU, C.; McARDLE, A.; BROWN, R. 1970. Intestinal mucosal lesion in low flow states. Arch. Surg. (USA).101:484-488.
- DABAREINER, R.; WHITE, N.; DONALDSON, L. 1998. Evaluation of Carolina rinse as a treatment for ischemia-reperfusion of the equine jejunum. Vet. Surg. (USA).27:521.
- DE MAIO, A.; MOONEY, M.; MATESIE, L. 1998. Genetics component in the inflammatory response induced by bacterial lipopolysaccharide. Shock (USA). 10:319-323.
- DEITCH, E.; GOODMAN, E. 1999. Prevention of multiple organ failure. Surg. Clin. North Am. 79:1471-1488.
- FALEIROS, R. 1997. Isquemia e reperfusão experimental no cólon menor de eqüinos. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (Brasil). 70p.
- FUKAI, M.; TAKAOKI, H.; YOKOTA, R. *et al.* 2005. Lipid peroxidation during ischemia depends on ischemia time in warm ischemia and refusion of rat liver. Free Rad. Biol & Med. 38: 1372-1381
- GIANOTTI, L.; NELSON, J.; ALEXANDER, J. 1994. Post injury hypermetabolic response and magnitude of traslocation: prevention by early enteral nutrition. Nutrition (USA). 10:225-228.
- GROTZ, M.; DING, J.; GUO, W. 1995. Comparison of plasma cytokine levels in rats subjected to superior mesenterio artery occlusion or hemorrhagic shock. Shock (USA). 3:362-368.
- HAGLUND, U.; BERGQVIST, D. 1999. Intestinal ischemia the basics. Langenbacks Arch. Surg. 384:233-238.
- JARRAR, D.; CHAUDRY, H.; WANG, P. 1999. Organ dysfunction following hemorrhage and sepsis: mechanisms and therapeutic approaches (review). Int. J. Mol. Med. (USA). 4:575-583.
- MOORE, R.; MUIR, W.; GRANGER, D. 1995. Mechanism of gastrointestinal reperfusión injury and potencial therapeutic interventions: A review and its implications in the horse. J. Vet Int. Médica (USA). 9:281-301.
- OHRI, S. 1996. Systemic inflammatory response and the splanchnic bed in cardiopulmonary bypass. Perfusion (USA). 11:200-212.
- PARK, P.; HAGLUND, U.; BULKLEY, G. 1990. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. Surgery (USA). 107:574-580.

- RAFFAN, F.; KLIN, J. 2000. Síndrome de reperfusión; fisiopatología, prevención y manejo. Fundación Santa Fe de Bogotá, Universidad del Bosque (Bogotá). p.13-25.
- REEVES, M.; VASTEENHOUSE, J.; STASHAK, T. 1990. Failure to demonstrate reperfusion injury following ischaemia of the equine large colon using dimethyl sulphoxide. *Equine Vet. J. (USA)*. 22:126-132.
- SHENKAR, R.; ABRHAM, E. 1993. Effects of hemorrhage on cytokine gene transcription. *Lymphokine Cytokine Res.* 12:237-247.
- STALLION, A.; KOU, T., MILLER, K. 2002. IL-10 is not protective in intestinal ischemia reperfusion injury. *J. Surg. Res. (USA)*. 105:145-152.
- STALLION, A.; TZUYUNG, K.; BERGER, D. 2004. Intestinal production of IL-6 initiates systemic inflammation in a murine model of intestinal ischemia reperfusion. *Gastroenterology (USA)*. 116:A-933-945.
- STALLION, A.; TZUYUNG, K.; LATIFI, S. 2005. Ischemia/reperfusion: a clinically relevant model of injury yielding systemic inflammation. *J. Ped. Surg. (USA)*. 40:470-477.
- TELLO, L.; TORRES, P. 2001. Shock y síndrome isquemia reperfusión. *Rev. Anestesiología (Uruguay)*. 6:28-36.
- TRENTZSCH, H.; STEWARD, D.; PIDAS, C. 2003. The combination of polymicrobial sepsis and endotoxin results in an inflammatory process that could not be predicted from the independent insults. *J. Surg. Res. (USA)*. 111:203-208.
- VALIENTE, A.; CARBALLO, A.; PEREZ, R.; QUINTELA, A.; RABRAZA, M.; MARTINEZ, M. 2000. Modelo Isquemia reperfusión en miembros inferiores de ratas. *Rev. Cubana Angiol y Cir. Vasc.* 1(1):1-6.
- VATISTAS, N.; SNYDER, J.; HILDEBRAND, S. 1996. Effects of U-74389G, a novel 21-aminosteroid, on small intestinal ischemia and reperfusion injury in horses. *Am. J. Vet. Res.* 57:762-770.
- VINAY, K.; COTRAN, L.; ROBBINS, L. 2004. *Robbins patología humana*. Elsevier (España). Séptima edición. p.873
- YASIM, M. 1996. Mortality following lower limb ischemia reperfusion: a systemic inflammatory response? *World. J. Surg.* 20:961-967.

Recibido: Enero 26 de 2007

Aceptado: Mayo 8 de 2007

INDUCCIÓN DE ESTRO EN YEGUAS CON UNA DÓISIS REDUCIDA DE PROSTAGLANDINA F₂ α , EN EL ESPACIO LUMBO SACRO (ACUPUNTO BAI HUI)¹

INDUCTION OF ESTRUS IN MARES UTILIZING A MICRO-DOSE OF PROSTAGLANDIN F₂ α , IN THE SACRAL LUMBAR SPACE (BAI HUI ACCUPOINT)

Edna Margarita Pardo Prieto ²
Valsair de Mattos Pessoa ³

RESUMEN

El presente estudio, se realizó en el Hospital Veterinario de la Universidad do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente – SP, Brasil. El objetivo fue evaluar la inducción de estro en yeguas con una dosis reducida de PGF₂ α (0,015mg), (D-Cloprostenol - Croniben®), administrada en el punto de acupuntura BAI-HUI, localizado en el espacio lumbo sacro. Se utilizaron 15 yeguas sin raza definida (SRD), entre 5 y 10 años de edad, con una condición corporal de 3,3 y un peso aproximado de 350kg, las cuales fueron examinadas por palpación transrectal para confirmación de la condición del aparato genital,

estando todas ciclando regularmente. Después de la aplicación de la PGF₂ α , se observaron durante cinco días consecutivos. Los datos obtenidos indican que la PGF₂ α administrada en el punto de acupuntura BAI-HUI en una dosis reducida, es igualmente efectiva que la dosis convencional en la inducción de estro en yeguas.

Palabras clave: Yeguas, PGF₂ α , sincronización, acupuntura, BAI-HUI.

SUMMARY

The present study was carried out at the University of Western Paulista (UNOESTE) Veterinary Hospital, Presidente Prudente – SP, Brazil. The objective was to examine the induction of estrus in mares with a micro-dose of PGF₂ α (0.015 mg), (D-Cloprostenol - Croniben®), administered at the BAI-HUI acupuncture point, in the sacral lumbar space. Fifteen no specific breed mares, between 5 to 10 years, with 3.3 of body condition and with approximately 350kg were used; regular estrum cycles and reproductive tract condition were confirmed by transrectal palpation. After the application of the PGF₂ α each mare was observed during five consecutive days. The study showed that micro-dose of PGF₂ α administered at the BAI-HUI acupuncture point, at a micro-dose, is as effective as the conventional dose applied for mare estrum induction.

¹ Trabajo de investigación realizado como requisito parcial para la conclusión de la pasantía Internacional de la carrera de Medicina Veterinaria Zootecnia.

² Médica Veterinaria Zootecnista U.D.C.A. Especialista en Reproducción Bovina. Universidad Nacional de Cordoba, Argentina, Correo electrónico: biorepro@gmail.com

³ Médico Veterinario. M.Sc. Reproducción animal, Docente – Investigador. Facultad de Medicina Veterinaria, UNOESTE. P. Prudente – SP, Brasil. Colombia.

Key words: Mares, PGF2 α , synchronization, acupuncture, BAI-HUI.

INTRODUCCIÓN

En la especie equina, el ciclo estral dura en promedio 20 a 23 días (Frandsen & Spurgeon, 1992) y está sujeto a presentar mayor variabilidad entre todos los animales domésticos, razón por la cual la yegua es considerada una especie poliéstrica estacional (Hinrichs, 1997), con fotoperíodo positivo, es decir, que presenta varios ciclos estrales durante la temporada reproductiva y se encuentra regulada por la cantidad de horas luz (Gigli *et al.* 2006). Durante el estro o período de receptividad sexual, se pueden observar cambios de comportamiento y postura de la yegua, además de un aumento gradual en la vascularización del tracto genital y relajamiento del cervix con dilatación del orificio, presentando un olor particular que constituye la principal atracción para el macho. Sharp (1998) sugiere que este período puede tener un promedio de duración de 2 a 3 días, superando algunas veces los 10 días. La sustancia uterina responsable de la presentación de esta fase del ciclo es la prostaglandina F2 α (PGF2 α), al producir la regresión del cuerpo lúteo (Cunningham, 2003), cuando hay ausencia de un reconocimiento materno de la preñez (Gigli *et al.* 2006). Ésta comienza a ser sintetizada y liberada de una forma pulsátil, aproximadamente 14 días después de la ovulación (George *et al.* 1999). Esta síntesis de liberación debe ser por medio de pulsos con un intervalo de seis horas, para que se pueda obtener la luteólisis (McCracken, 1998). Aun así, las yeguas parecen tener una predisposición de la especie para el desenvolvimiento del cuerpo lúteo persistente y existen, por lo menos, dos explicaciones posibles para que esto suceda: la primera es que las enzimas formadas para la síntesis de PGF2 α (peroxidasa, ciclooxigenasa, isomerasa, TXsintetasa y enzimas desdobladoras) no estén disponibles a nivel intracelular y, la segunda es que la señal para el inicio de la síntesis y la liberación de PGF2 α sea inadecuada (George *et al.* 1999). Sin embargo, la alta afinidad de los receptores de LH de las células luteales, también permiten que el cuerpo lúteo permanezca activo (Gigli *et al.* 2006).

Las prostaglandinas, se han utilizado con frecuencia para el control reproductivo de los animales domésticos, siendo la PGF2 α natural y sintética, la más importante en medicina veterinaria, la cual es altamente efectiva

para corregir disturbios de la reproducción e inducir la actividad sexual, principalmente por medio de la sincronización del estro y el control de la ovulación. Las prostaglandinas sintéticas presentan características químicas y actividad semejante a la de hormonas naturales e interfieren en el metabolismo animal, propiciando un mejor desempeño reproductivo (Pardo, 2003). Sin embargo, la administración exógena de hormonas naturales tiene poco valor en la mayor parte de las situaciones en el transcurso de su vida media relativamente corta (Hafez, 1996).

Según Alvarenga *et al.* (2006), dentro de las diferentes hormonas utilizadas para el manejo reproductivo de las yeguas, la PGF2 α y sus análogos son las más comunes. Además, se afirma que de las especies domésticas estudiadas, la yegua es la más sensible a los efectos luteolíticos por su aplicación sistémica (intramuscular o subcutánea). Por ejemplo, Hafez (1996), cita que la administración sistémica de PGF2 α es tan eficiente para provocar luteólisis en yeguas histerectomizadas así como en intactas, indicando que el lugar de acción principal de la PGF2 α exógena no es a nivel uterino. Además, afirma que, en general, la PGF2 α estimula las contracciones del útero y provoca constricción de los vasos sanguíneos en la hembra, causando reducción del riego sanguíneo para el ovario que contiene el cuerpo lúteo, lo que provoca una pronta parada de secreción por el cuerpo lúteo y conlleva a una merma en la síntesis de progesterona, según se verifica por la rápida disminución de los niveles plasmáticos de la misma. La infusión de 10mg de PGF2 α en los días 7 a 9 después de la ovulación causa una disminución aguda en los niveles plasmáticos de progesterona e induce el celo y la ovulación (Hafez & Hafez, 2002). El mecanismo por el cual la PGF2 α actúa del endometrio hacia el ovario es porque ésta tiene que pasar a través de la circulación general (transferencia sistémica) para llegar al ovario o ser transferida de la vena útero-ovárica para la arteria ovárica por mecanismos de transferencia local, lo cual permite la conservación de la molécula, biológicamente activa. En las yeguas, la PGF2 α es transferida efectivamente a través de la circulación general y dos condiciones deben existir para que eso ocurra: la producción de altas tasas de PGF2 α y una baja tasa de su degradación en los pulmones (Swenson & Reece, 1999).

La síntesis de PGF2 α en la yegua comienza minutos después de su infusión y la regresión del cuerpo lúteo

ocurre usualmente entre las 6 y 9 horas siguientes (Cunningham, 2003). Alvarenga *et al.* (2006) relatan que la aplicación de PGF2 α o alguno de sus análogos a yeguas que tengan un cuerpo lúteo maduro, resulta en la presentación del estro 2 a 4 días y la ovulación 7 a 12 días después de su aplicación. Bristol (1986), por su parte, menciona que la ovulación ocurre del día 2 al día 12 después de la aplicación del tratamiento de la fase luteal con PGF2 α . Entonces, es posible que la administración de PGF2 α o de uno de sus análogos normalmente iniciara la regresión del cuerpo lúteo persistente lo que permitiría que el folículo dominante se desarrolle y produzca estrógenos, presentándose finalmente el estro dentro de pocos días, según lo sugiere Cunningham (2003). Él afirma que el retorno precoz al estro se basa en que los folículos ováricos tienden a desarrollarse continuamente durante un síndrome de persistencia de fase luteal. Sin embargo, describe que el uso de la PGF2 α , como agente luteolítico en grandes animales domésticos, requiere que ésta sea conservada a través de un sistema especial de transferencia o que sea producida en cantidades relativamente grandes.

Según Weber *et al.* (2001), una administración de PGF2 α directamente en el cuerpo lúteo persistente, induce luteólisis, lo que indica una disminución significativa en el intervalo inter-ovulatorio y en el intervalo de edema uterino ocurrido en yeguas tratadas con 5mg de PGF2 α intramuscular o 0,1mg de PGF2 α intraluteal, pero afirman que esto no ocurriría en yeguas tratadas con 0,1 o 0,01mg de PGF2 α intramuscular y 0,01mg de PGF2 α intraluteal. Por otro lado, Hafez (1996) relata que la administración intramuscular de 1,25 mg de PGF2 α es tan eficaz como la subcutánea y es la mínima dosis eficiente sistémica para inducción de luteólisis, y manifiesta que la administración intra-uterina o directamente dentro del cuerpo lúteo no mejora la eficiencia luteolítica de la inyección intramuscular de PGF2 α .

Otro estudio realizado por Troedsson *et al.* (2001), reveló que la inyección de PGF2 α en dosis repetidas 24 horas antes de la inseminación artificial durante los días 0, 1 y 2 después de la ovulación, tuvo un efecto perjudicial en la función luteal, reduciendo el tiempo de fertilización. Cuando la PGF2 α fue administrada inmediatamente después del día dos, igualmente resultó en una reducción de la función luteal y el tiempo de fertilización. Aunque los niveles de progesterona fueron recuperados después de la administración de la PGF2 α , la interrupción del

desarrollo del cuerpo lúteo y la disminución del tiempo de fertilización, claramente demostraron la importancia del cuerpo lúteo funcional para el día de la ovulación. En cuanto a otros aspectos relacionados con el control reproductivo de la yegua, Meyers (1997) sugiere la administración de la PGF2 α para la inducción del parto y la interrupción de la preñez; dice que es particularmente potente para provocar abortos.

La acupuntura en la reproducción animal: La acupuntura es un método terapéutico que forma parte de la medicina tradicional China, la cual considera el cuerpo como un sistema de flujo de energía y ha sido utilizada para la aplicación de medicamentos en puntos específicos o acupuntos, por medio de la inserción de agujas a través de la piel, buscando de esta manera mejorar la eficiencia de los medicamentos. Uno de los puntos más estudiados en Medicina Veterinaria es el BAI-HUI, el cual ha sido utilizado por algunos autores para diversos tratamientos relacionados con el sistema reproductivo, por ejemplo, Lin (1994) lo utilizó, con el fin de obtener efectos terapéuticos en animales con anestros, impotencia, aborto y disturbios hormonales. Por otro lado, Snader (1994), lo recomienda para el tratamiento de problemas reproductivos, tales como infertilidad en yeguas y garañones, alteraciones hormonales o ciclo irregular, anestros, hemorragia uterina y muerte embrionaria sin lesiones uterinas. Según Alvarenga *et al.* (1998), otros autores lo han utilizado para aplicaciones de Gonadotropina Coriónica humana (hCG), prostaglandina F2 α (PGF2 α) y de otras hormonas para el tratamiento de alteraciones del útero y ovarios en yeguas. Chan *et al.* (2001), afirman que el acupunto BAI-HUI asociado al punto Weiken, es utilizado también para la prevención de abortos, distocias y retención de placenta.

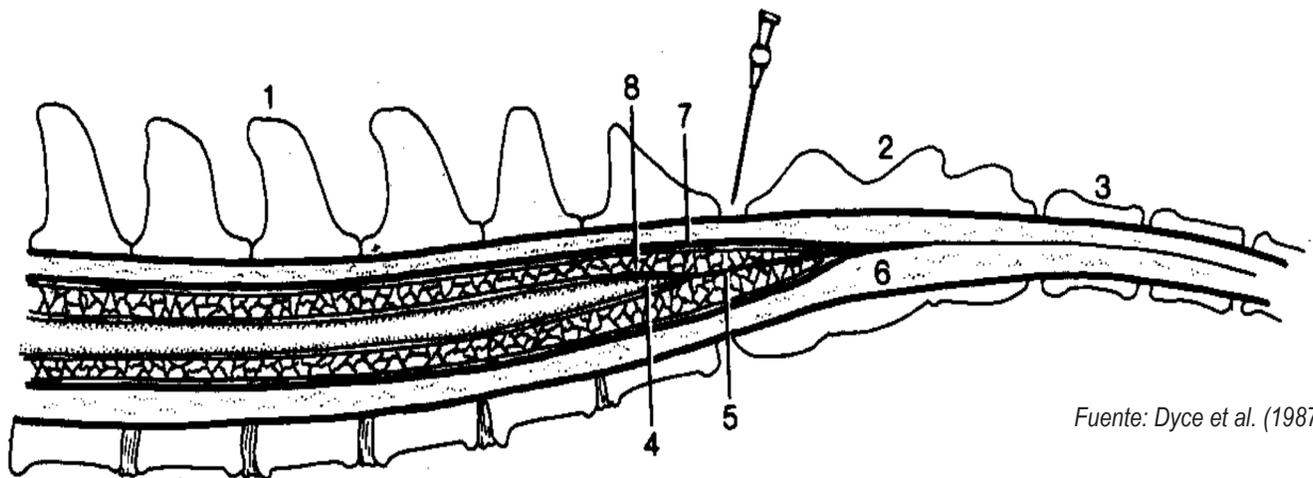
Un trabajo realizado por Alvarenga *et al.* (1998), en 23 yeguas, demostró que la aplicación de una dosis de PGF2 α en el BAI-HUI o espacio lumbo sacro indujo luteólisis similar a la obtenida con la dosis de aplicación intramuscular, siendo que la dosis aplicada en el acupunto BAI-HUI fue de 0.5 mg, y la dosis de aplicación intramuscular fue de 5,0mg, respectivamente. Según Ramey *et al.* (2001), este trabajo demostró que la actividad reproductiva fue tan eficiente para la inducción de la luteólisis como para la disminución del intervalo inter-ovulatorio. Otro estudio realizado por Nie *et al.* (2001), en el Colegio de Medicina Veterinaria de Auburn USA, demostró que la administración de PGF2 α en el

acupunto BAI-HUI de yeguas, no presentó ventajas sobre la intramuscular para la inducción de la luteólisis o para acortar el intervalo inter-ovulatorio. Sin embargo, la administración de una micro-dosis de análogo Cloprostenol fue efectiva induciendo luteólisis y reduciendo el intervalo ovulatorio.

Luna *et al.* (1999) describen que la media del intervalo inter-ovulatorio y el tratamiento en yeguas con aplicación de 0,5mg de PGF2 α entre las vértebras L4 – L5 (acupunto vasogobernador 3 o GV 3) fueron los mismos observados en yeguas tratadas con 0,5mg de PGF2 α en el espacio lumbo sacro (BAI-HUI) y 5mg de PGF2 α

(dosis convencional) intramuscular. Ellos concluyeron que los acupuntos BAI-HUI y GV 3, de algún modo aumentan extremadamente la eficiencia a nivel ovárico de la PGF2 α .

El acupunto BAI-HUI esta localizado sobre la línea media dorsal, en una depresión situada entre las ápices de las apófisis espinosas de la última vértebra lumbar y la primera vértebra sacra (Rubin, 1983), como se puede observar en la figura 1, elaborada por Dyce *et al.* (1987), en la cual hay un corte sagital mediano del canal vertebral y sus componentes, donde la aguja apunta al espacio lumbo sacro, denominado en acupuntura como BAI-HUI.



Fuente: Dyce *et al.* (1987)

1=vértebra lumbar, 2=sacro, 3=vértebra caudal, 4=corte medular, 5=filamento terminal, 6=espacio epidural, 7=dura - máter, 8=espacio subaracnóide con líquido cerebroespinal.

Figura 1: Esquematación de un corte sagital mediano del canal vertebral y sus componentes. La aguja apunta al espacio lumbo sacro.

Basados en estas informaciones, el presente estudio tuvo el objetivo de evaluar el efecto de una dosis reducida de PGF2 α en yeguas, al ser administrada en el acupunto BAI-HUI, localizado en el espacio lumbo sacro.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue realizado en el Hospital Veterinario de la Universidad do Oeste Paulista (UNOESTE), situada en la ciudad de Presidente Prudente, Estado de São Paulo, Brasil. Se utilizaron 15 yeguas sin raza definida (SRD),

entre 5 y 10 años de edad, con una condición corporal de 3,3, en la escala de clasificación de 1 – 5 y un peso aproximado de 350kg. La alimentación de las yeguas, se basaba en un sistema de pastoreo intensivo, con pasto *Cynodon dactylus* L., sal mineral y agua a voluntad. Estos animales son vacunados anualmente contra tétano, influenza equina, encefalomielititis y adenitis. Reciben vermífugo cada 60 a 90 días para el control parasitario.

Todas las yeguas fueron examinadas para confirmación de la condición del aparato genital, realizando una ins-

pección visual del periné, vulva y cola, y una palpación trans-retal del cervix, útero y ovarios, estando todas ciclando, regularmente. Se dividieron en dos grupos de la siguiente manera: en el grupo 1 $n=10$, fue aplicado 0,015mg de análogo sintético de $PGF2\alpha$ (D-cloprostenol-Croniben®) de la dosis recomendada por el laboratorio, diluido en mL de solución fisiológica al 0,9%, en el espacio lumbo sacro o acupunto BAI-HUI, como se puede observar en las figuras 1 y 2; en el grupo 2 $n=5$, se aplicó 5mL de solución fisiológica (Solución isotónica de cloruro de sodio al 0.9%), en el mismo punto. Para determinar la dosis de $PGF2\alpha$ y elegir el protocolo, se tuvieron en cuenta las dosis menores a las utilizadas por otros autores, en este mismo punto de aplicación. Las aplicaciones, se realizaron con jeringas desechables de 5mL y agujas 40 x 12. Inmediatamente después de este

procedimiento, fueron observadas las manifestaciones comportamentales de estro con el auxilio del garañón, dos veces al día, en la mañana (8:00 - 9:00 h) y en la tarde (17:00 - 18:00 h), durante cinco días consecutivos. Al inicio de los signos característicos del estro, como inquietud, elevación de la cola, postura de micción y eliminación de orina repetidamente, exposición del clítoris de forma rítmica y congestiónamiento general del aparato genital, las yeguas fueron palpadas vía trans-retal para el control folicular y confirmación del estro. Los datos obtenidos fueron registrados de forma individual en una tabla marcando el espacio correspondiente a cada yegua, dependiendo del día y hora de presentación de las señales de estro y, posteriormente, analizados con el test no paramétrico, citado por Campos (1983) y conocido como "test binomial".



Fuente: Pardo (2003).

Figura 2: Lugar de localización del punto de acupuntura BAI-HUI en una yegua, para la aplicación de la prostaglandina.

El test binomial es particularmente útil en experimentos que apenas admiten dos alternativas de respuesta, tales como verdadero o falso, masculino o femenino, positivo o negativo y así sucesivamente. Se utiliza para el desarrollo matemático binomial de dos frecuencias relativas complementarias p y q (siendo $p + q = 1$) y para evaluar la probabilidad de estas, se podrían considerar estadísticamente no diferenciadas, aun si son desiguales en tiempos numéricos. Así, los datos

experimentales utilizados por el test son frecuencias relativas p y q , referentes a dos alternativas posibles en el experimento determinado. La frecuencia esperada para p y q , en caso de una igualdad perfecta, sería $\frac{1}{2}$ para ambos. Pero como en un experimento difícilmente p es igual a q , el test evalúa como último análisis, hasta que punto los valores de p y q pueden diferir sin dejar de ser estadísticamente iguales (Maia, 2001).

Este test exige tres características que son: cada resultado como suceso o falla, probabilidad de suceso siempre constante y las n tentativas son independientes. Entonces, B = número de sucesos (yeguas que presentaron estro) en las n tentativas, teniendo en cuenta que B es una variable con distribución binomial de parámetros n y P . Donde n = número de tentativas (Yeguas del tratamiento) y P = probabilidad de suceso. El test binomial aplicado para (inducción de estro) tenía los siguientes datos: $n = 10$, $B = 7$, $P_0 = 0,5$, $P = 0,7$ y fue hecho a nivel $\alpha = 0,05$ de significancia. El análisis se realizó de la siguiente manera: la hipótesis nula $H_0: P = P_0$ versus la hipótesis alternativa $H_a: P \neq P_0$, donde se rechaza H_0 cuando el valor de P es mayor de 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cálculos estadísticos realizados comparados con los resultados de los valores constantes del libro “Estadística no paramétrica” de Campos (1983), nos permiten afirmar que en las condiciones experimentales: la hipótesis nula $H_0: P = 0,5$ y la hipótesis alternativa $H_a: P \neq 0,5$,

por lo tanto, se puede rechazar la hipótesis nula de H_0 y $P_0 (B \neq 7) = 0,9990$ puesto que ese valor es mayor que 0,05. Los resultados demuestran un mayor número de sucesos, según lo descrito en la hipótesis, lo que justifica el rechazo de la misma.

Es evidente que la $PGF2\alpha$ es efectiva en la inducción de la luteólisis y de acuerdo con lo reportado por otros autores, como Hafez (1996), Alvarenga *et al.* (1998), Luna *et al.* (1999), Luna (2000), Weber *et al.* (2001) y Hafez & Hafez (2002), vemos que esto se puede lograr con diferentes dosis y vías de aplicación.

El presente estudio coincide con los realizados por Alvarenga *et al.* (1998) y Luna *et al.* (1999), en los cuales la aplicación de la $PGF2\alpha$ en dosis reducida en el acupunto BAI-HUI, mostró los mismos efectos que la aplicación de dosis convencional por vía intramuscular. Se buscó hacer una réplica de los mismos al suministrar la $PGF2\alpha$ en el BAI-HUI, pero utilizando una dosis inferior a la citada por estos autores en sus trabajos. Los datos registrados se pueden observar en la figura 3.

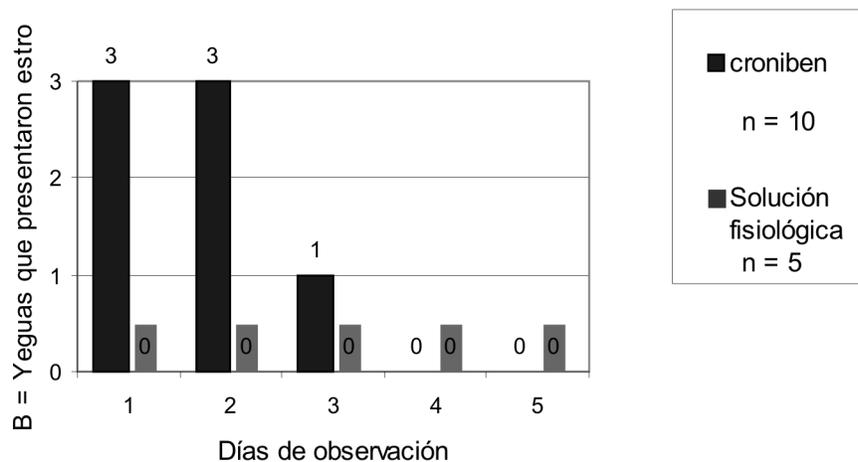


Figura 3: Número de yeguas que presentaron estro durante los días de observación del estudio, después de la aplicación del tratamiento en el acupunto BAI-HUI.

Se obtuvo un óptimo resultado al suministrar el 10% de la dosis recomendada (0,015mg) de $PGF2\alpha$ en el acupunto BAI-HUI, presentándose señales de estro en el 70% de las yeguas tratadas. Se demostró nuevamente que la utilización de la acupuntura asociada a la medicina

convencional en medicina veterinaria puede mejorar las cualidades de los medicamentos, las hormonas y otras sustancias que al ser administradas en dosis reducidas en los puntos de acupuntura, pueden obtener la misma función que la de las dosis convencionales. Es decir, que

de acuerdo con el análisis estadístico no paramétrico realizado por la media del test binomial, conforme lo descrito por Campos (1983), una vez más la droga utilizada para la inducción de estro (D – Cloprostenol - Croniben®), en una dosis reducida, demostró ser efectiva. Y si relacionamos la vía de aplicación utilizada con las de otros autores citados en el texto, se confirma que no es necesario el uso de la dosis convencional de PGF2 α en la yegua para lograr la inducción del estro.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demostraron que la aplicación de análogo sintético de PGF2 α (D - Cloprostenol) en una dosis de 0,015 mg en el espacio lumbo sacro o acupunto BAI-HUI fue altamente efectiva para la inducción de estro en yeguas, aún cuando la época del año, según la estación, no era la indicada para la presentación de esta fase del ciclo estral. De tal forma que se puede afirmar que el acupunto BAI-HUI aumenta la eficiencia de la PGF2 α a nivel ovárico y, de este modo, la inducción del estro. Esto también trae un beneficio económico, al utilizar dosis menores y aun así, lograr la ciclicidad de las yeguas para una posterior preñez.

Por lo tanto, se recomienda la administración de una dosis reducida de PGF2 α en el acupunto BAI-HUI, en la sincronización de estro en yeguas, teniendo en cuenta las características fisiológicas necesarias para el funcionamiento de la misma a nivel ovárico. Sin embargo, es muy importante la realización de nuevos estudios en el área de investigación, para ampliar los datos obtenidos y tener otros parámetros de evaluación.

BIBLIOGRAFÍA

- ALVARENGA, M.A.; DAS, C.B.; MOREIRA, L.G. 2006. Avances en hormonoterapia de la yegua. En: Memorias V Seminario de reproducción en grandes animales. CGR Biotecnología Reproductiva. 20 - 22 de Abril, Bogotá, Colombia. CD interactivo.
- ALVARENGA, M.A.; FERREIRA, J.P.; MEIRA, C.; LUNA, S. P.; BURNS, P.J. 1998. Induction of luteolysis in mares utilizing a micro-dose of prostaglandin F2 α in the sacral lumbar space. *J. Equine Vet. Science*. San Dimas. 18(3):167-168.
- BRISTOL, F. 1986. Estrous synchronization in mares. En: Morrow, D.A. *Current therapy in theriogenology 2. Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals*. W. B. Saunders Co. Philadelphia, Pennsylvania. p.661-664.
- CAMPOS, H. 1983. *Estatística experimental não-paramétrica*. 4^o ed. Fundação de estudos agrários "Luis de Queiroz", FEALQ. Piracicaba – SP, Brasil. p.233-243.
- CHAN, W.W.; CHEN, K.Y.; LIU, H.; WU, L.; LIN, J.H. 2001. Acupuncture for general veterinary practice. *J. Vet. Medical Science (Japón)* 63(10):1057-1062.
- CUNNINGHAM, J.G. 2003. *Fisiología veterinaria*. 3^a ed. Elsevier España S. A. Madrid, p.382-395.
- DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J. 1987. *Tratado de anatomía veterinaria*. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro – RJ. 358p.
- FRANDSON, R.D.; SPURGEON, T.L. 1992. *Anatomy and physiology of farm animals*. 5^a ed. Waverly Inc. State of Maryland, USA. p.423-428.
- GEORGE, H.; STANBENFELDT, G.; LARS-ERIC, E. 1999. Procesos de la reproducción de la hembra. En: Swenson, M.J.; Reece, W.O. *Fisiología de los animales domésticos de Dukes*. Tomo 2. 5^a ed. Edit. Limusa, S. A. Balderas 95, México, D. F. p.678-693.
- GIGLI, I.; RUSSO, A.; AGÜERO, A. 2006. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet. (Argentina)*. 8(1):1514-6634.
- HAFEZ, E.S.E. 1996. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 6^o ed. Nueva editorial Interamericana S. A. México. 94-97, p.339-350.
- HAFEZ, E.; HAFEZ, B. 2002. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7^a ed. McGraw-Hill Interamericana editores S. A. México, D. F. p.61-65, 203-206.

- HINRICHS, K. 1997. Irregularities of the estrous cycle and ovulation in mares. En: Youngquist, R.S. Current therapy in large animal theriogenology. W. B. Saunders Co. Philadelphia, Pennsylvania. p.166-171.
- LIN, J.H. 1994. Acupuncture for reproductive disorders. En: Schoen, A.M. Veterinary Acupuncture: Ancient Art to Modern Medicine. American Veterinary Publications Inc. New York. p.235-240.
- LUNA, S.P.; JOAQUIM, J.G.; MINICHELLI, M.; ALVARENGA, M.A.; BARROS, C.M. 1999. The role of acupoint BaiHui for induction of luteolysis in mares. En: Memorias Brazilian Veterinary Acupuncture Congress, 6 - 8 Agosto. Botucatu, São Paulo, Brasil. Disponible desde Internet en: www.fmvz.unesp.br/departamentos/cirurgia/public/pub165.htm. (con acceso 05/05/03)
- LUNA, S.P. 2000. Acupuntura e sistema reproductivo. En: Memorias, Congreso Brasileiro de Acupuntura Veterinária. 12 - 14 de Octubre, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Disponible desde Internet en: www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc_livro/gmc_livro_cap19.htm (con acceso 24/05/03)
- MAIA, C.G. 2001. Filosofia de alguns testes estatísticos. Estatística prática para docentes e pós-graduados. (19b):1 [publicación en línea]. Disponible desde Internet en: www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc_livro/gmc_livro_cap19.html (con acceso el 24/05/03).
- McCRACKEN, J.A. 1998. Luteolysis. En: Knobil, E.; Neill, J.D. Encyclopedia of Reproduction. Vol. 2. Academic Press. San Diego, Ca 92101-4495, USA. p.1083-1094.
- MEYERS, P.J. 1997. Control and synchronization of the estrous cycle and ovulation. En: Youngquist, R.S. Current therapy in large animal theriogenology. W. B. Saunders Co. Philadelphia, Pennsylvania. p.96-102.
- NIE, G.J.; GOODIN, A.N.; BRADEN, B.S.; WENZEL, J.G. 2001. Luteal and clinical response following administration of dinoprost tromethamine or cloprostenol at standard intramuscular sites or at the lumbosacral acupuncture point in mares. Am. J. Vet. Res. 62(8):1285-1289.
- PARDO P., E.M. 2003. Indução do estro em eguas com uma dose reduzida de prostaglandina F2 α , no espaço lumbo sacro. Trabajo de investigación presentado en la Universidade do Oeste Paulista UNOESTE, como requisito parcial para la conclusión de la pasantía internacional de la carrera de Medicina Veterinaria Zootecnia U.D.C.A. p.16-61.
- RAMEY, D.W.; LEE, M.L.; MESSER, N.T. 2001. A review of the western language equine acupuncture literature. J. Equine Vet. Science. San Dimas. 21(2):56-60.
- RUBIN, M. 1983. Manual de acupuntura veterinária. Organização Andrei Editora Ltda. São Paulo, Brasil. 159p.
- SHARP, D.C. 1998. Horses. En: Knobil, E.; Neill, J.D. Encyclopedia of Reproduction. Vol. 2. Editorial Acad. Press. San Diego, Ca 92101-4495, USA. p.680-693.
- SNADER, M.L. 1994. Acupuncture treatment for miscellaneous conditions in horses. En: Schoen, A.M. Veterinary Acupuncture: Ancient Art to Modern Medicine. Am. Vet. Publications Inc. New York. p.556-558.
- SWENSON, M.J.; REECE, W.O. 1999. Fisiología de los animales domésticos de Dukes. Tomo 2. 5^o ed. Editorial Limusa, S. A. Balderas 95, México, D. F. p.697-698.
- TROEDSSON, M.H.T.; OHLGREN, A.F.; ABABNEH, M.M.; GREGAS, M. 2001. Effect of periovulatory prostaglandin F2 α on pregnancy rates and luteal function. Theriogenology. (USA. 55(9):1891-1899.
- WEBER, J A.; CAUSEY, R.C.; EMMANS, E.E. 2001. Induction of luteolysis in mares by ultrasound-guided intraluteal treatment with PGF2 α . Theriogenology. 55(9):1769-1776.

Recibido: Mayo 11 de 2006
Aceptado: Abril 14 de 2007

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE SEIS MICROSATÉLITES EN EQUINOS COLOMBIANOS *Equus caballus* (Equidae) Y SU USO EN PRUEBAS DE FILIACIÓN

GENETIC CHARACTERIZATION OF SIX MICROSATELLITES IN COLOMBIAN HORSES *Equus caballus* (Equidae) AND ITS USE FOR PARENTAGE TESTING

Alexandra Gómez Tarazona ¹
Fernando Ariza Botero ²
Ligia Jiménez Robayo ³

RESUMEN

Los equinos colombianos son una especie de gran importancia social, cultural y comercial, pero el desconocimiento de su potencial genético ha limitado los programas de selección y de mejoramiento. Para dar inicio a este proceso, se evaluó la variabilidad genética de 264 caballos pertenecientes a las razas equinas caballo criollo colombiano, paso fino colombiano y trocha pura colombiana. La caracterización alélica, se hizo con seis marcadores moleculares tipo microsatélite (ASB17, AHT4, AHT5, HTG4, HMS3 y HMS6) para un posterior estudio poblacional. El análisis genético de los seis microsatélites indica alto polimorfismo alélico para el locus ASB17 con 18 alelos, siendo el menos variable es el HTG4, con siete alelos; el número promedio de

alelos fue de 9,83. Las frecuencias alélicas muestran que las poblaciones están representadas por pocos alelos. Para determinar la variabilidad genética en la población, se calculó la diversidad génica H_e 0,773 y H_o 0,765 indicando una alta variabilidad. Por otra parte, se encontró una alta diversidad genética en los caballos de Cundinamarca, con un coeficiente de endogamia F_{is} 0,0011. Para los casos de filiación, los loci AHT4 y HMS3 demostraron ser los más informativos por sus altos valores en la probabilidad de exclusión; sin embargo, el valor de probabilidad acumulada de 0,9543 con los seis marcadores relativamente bajo. Se recomienda cambiar los marcadores AHT4 y HMS6 por otros más informativos y aumentar el número de marcadores en el caso de su uso en pruebas de paternidad.

Palabras clave: equinos colombianos, diversidad genética, microsatélites, frecuencias alélicas.

SUMMARY

In terms of commercial and cultural implications Colombian equines are very valuable; however their genetic potential is unknown. As a result, programs regarding

¹ Médico Veterinario M.Sc. U.N. Instituto de Genética. U.N. e.mail: nagomez@unal.edu.co Dirección para correspondencia: Entrada Calle 53 con Cra. 37, Edificio 426, Of. 216.

² Médico Veterinario, M.Sc., PhD. Fac. de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, U.N.

³ Médico Veterinario, M.Sc. Fac. de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, U.N.

selection and improvement have been limited. In order to contribute to the genetic potential, the variability of 264 horses Criollo Colombiano, Paso Fino Colombiano y Trocha Pura Colombiana breeds was evaluated. The allelic characterization was made with six molecular markers, micro satellite sort (ASB17, AHT4, AHT5, HTG4, HMS3 y HMS6) for further population studies. The analysis of the six microsatellites indicated high allelic polymorphism for the ASB17 with 18 alleles, the less variable was the HTG4 with seven alleles. The allele's standard was 9.83. Besides, the allelic frequency showed that the populations are represented by few alleles. The gene diversity H_e 0.7773 and H_o 0.765 was calculated to determine the genetic variability of the population. It indicated a large variability and high gene diversity in equines from the department of Cundinamarca with an endogamy coefficient of F_{is} 0.0011. In the paternity test, the AHT4 and HMS3 demonstrated that they are the most informative ones; which is due to their high exclusion probability. Nevertheless, the accumulated probability validity of 0.9543 with the six markers was low. It is recommended to change the AHT4 and HMS6 markers for more informative ones and also to increase the number of markers.

Key words: Colombian horses, genetic diversity, microsatellites, allelic frequencies.

INTRODUCCIÓN

Los caballos colombianos están conformados por varias razas: criollo colombiano, paso fino colombiano, trocha pura colombiana y trote-galope reunido colombiano. Información sobre estas razas se encuentra en el banco de datos de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2004). Estas razas son de origen español y se respalda con informaciones históricas de los viajes de Colón y otros conquistadores (Rodero *et al.* 1992) y con estudios de ADN mitocondrial que han determinado las relaciones filogenéticas del caballo español con algunas razas suramericanas (Miro *et al.* 2002). Una vez fueron introducidos los caballos españoles, se dispersaron y se adaptaron a los diversos ambientes de Suramérica. Las consecuencias de esto son posibles modificaciones genotípicas y fenotípicas para el caballo asentado en el Nuevo Mundo. Las características fenotípicas del caballo colombiano y su buen desempeño deportivo hacen que sea una de las especies domésticas de gran reconocimiento e importancia económica, generando altos ingresos por su comercialización.

Las caracterizaciones sirven para establecer la situación actual de la variabilidad genética en una población, ya que las presiones demográficas y económicas pueden generar procesos que llevan al detrimento de las razas y algunas especies (FAO, 1997); así mismo, los procedimientos reproductivos en animales de granja, como los cruzamiento dirigidos, el apareamiento consanguíneo y la selección artificial pueden interferir en la variabilidad genética (Ron *et al.* 1996). En la especie equina, la caracterización de diferentes razas se ha realizado a nivel morfológico (Herrera & Navarrete, 1978) y molecular permitiendo describir las razas genéticamente (Cañon *et al.* 2000; Rodas, 2000). Igualmente, los marcadores han permitido establecer las diferencias entre ellas (Achmann *et al.* 2004), conocer la variabilidad genética (Kavar *et al.* 1999, Tozaki *et al.* 2003, Romero, 2000) y proponer procesos de manejo y selección de los recursos genéticos (Zabek *et al.* 2005; Ron *et al.* 1996), así como para el mantenimiento y conservación del patrimonio genético (Fernández *et al.* 2004, Ruiz- García *et al.* 2003).

Los marcadores moleculares microsatélites (STR) son repeticiones cortas que funcionan como loci co-dominantes, se heredan de forma mendeliana, son altamente polimórficos y están dispersos abundantemente en el genoma nuclear de los organismos eucariotes (Hancock, 1999; Weber & May, 1989). Los microsatélites han sido usados en las ciencias forenses en pruebas de filiación de caballos silvestres (Bowling, 1997), bovinos (Glowatzki-Mullis *et al.* 1995) y caninos (Cho & Cho, 2003) y en el control del linaje al mantener la rutina de la genotipificación de las poblaciones animales (Chikhii *et al.* 2004).

En otras especies, los microsatélites han permitido la elaboración de mapas de ligamiento (Womack, 2005), la evaluación del parentesco (Tozaki *et al.* 2001, Luikart *et al.* 1999) y la evaluación de susceptibilidad a enfermedades (Carrington *et al.* 1999).

Los caracterizaciones de los caballos colombianos en su gran mayoría han sido descripciones morfológicas (Virgüez, 2004, Estrada, 1995, Vivas, 1994 y Herrera & Navarrete, 1978) y siendo los estudios genéticos con marcadores moleculares en equinos colombianos escasos (Romero, 2000, Rodas, 2000). Además, estos no han determinado la estructura de la población equina colombiana. En este contexto, se realizó la genotipificación del ADN con seis marcadores microsatélites para

la identificación individual y verificación de filiación de caballos colombianos. Así mismo, se analizó la diversidad genética y se calculó el contenido de información polimórfica (PIC) y la probabilidad de exclusión (PE).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra de la población: Se colectaron muestras de sangre periférica de la vena yugular de 132 caballos no emparentados de la raza criollo colombiana, en Cundinamarca. Y otras 132 muestras corresponden a los registros de tipificación de equinos en Cundinamarca de las razas paso fino colombiano y trocha pura, registrados en Federación Colombiana de Asociaciones Equinas FEDEQUINAS.

Extracción de ADN y amplificación PCR: La genotipificación fue hecha con seis marcadores microsatélites recomendados para las pruebas de filiación por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG). Estos marcadores fueron AHT4 y AHT5 (Binns *et al.* 1995), ASB17, HMS3 y HMS6 y HTG4 (Ellegren *et al.* 1992). El ADN fue extraído por la técnica de fenol-cloroformo. Los seis microsatélites fueron amplificados solos en seis reacciones de PCR. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 15 μ L conteniendo 2 μ L de DNA, con: 3,0 μ L de ADN, 200 μ M de solución de dNTPs (Promega, USA), 10mM de buffer (100mM Tris-HCl, 500mM KCl, 1% Triton), 0,8 μ M de solución de cada primer, el MgCl₂ varió entre 1,5Mm y 2,0Mm y 0.5 U de Taq polimerasa (CORPOGEN®, Colombia) e iniciadores 20ng/ μ L. La amplificación fue llevada a cabo en un termociclador (GeneAmp PCR System PTC-100J, PE Applied Biosystems) usando las siguientes condiciones: una denaturación inicial a 95°C por 5min, seguido por 30 ciclos de 95°C por 30s, 64, 62, 60 o 59°C por 45s, y 72°C por 30s, la extensión final 72°C por 10min y estabilización 30°C por un minuto. Los microsatélites amplificados fueron separados en gel de poliacrilamida denaturante al 6%, seguido por la tinción de plata. La asignación de los alelos, se llevó a cabo manualmente, con controles positivos de equinos genotipificados previamente por la UC (Davis) y el patrón de peso molecular 10pb a 200pb con 10pb DNA ladder (Invitrogen USA). La nomenclatura de los genotipos, se basó en símbolos del alfabeto español, recomendada para equinos por el Horse Standing Committee of the International Society for Animals Genetics at Tours, France, 1996.

Análisis Estadístico: Las frecuencias alélicas fueron calculadas en los diferentes loci y para las dos agrupaciones usando el programa FSTAT (Goudet, 2001). El número total de alelos observados, heterocigocidad observada y diversidad genética, se estimaron para las poblaciones agrupadas usando el programa GENETIX (Belkhir *et al.* 2000). La desviación del equilibrio Hardy-Weinberg fueron estimadas para los seis loci y por agrupación mediante el programa GENEPOP version 1.2 (Raymond & Rousset 1995). La estructura genética fue analizada con los estadísticos F de Wright, según el método de Weir & Cockerham (1984) usando FSTAT (Goudet, 2001). Y se llevó a cabo, adicionalmente, un análisis multivariante con el método de análisis de correspondencias múltiples (ACM), el cual se ejecutó con el programa Multivariate Statistical Package (MVSP) 3.1 (<http://www.kovcomp.com>). Las distancias genéticas se calcularon con la distancia de cuerda de Cavalli-Sforza & Edwards (1967), opción incluida dentro del programa Genetix v.4.03 (Belkhir *et al.* 2000). Los estimadores de paternidad calculados fueron: la probabilidad de exclusión (PE), la probabilidad de exclusión combinada (PEC) y el contenido de información polimórfica (PIC), mediante el programa CERVUS (Marshall *et al.* 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los caballos criollos de Cundinamarca, en seis loci, se detectaron 54 alelos, mientras que en la agrupación correspondiente a FEDEQUINAS, se observaron 59 alelos. La diferencia se presentó en los loci ASB17 con 14 y 18 alelos, respectivamente y AHT5 con el alelo S en la agrupación de Fedequinas. El locus de mayor polimorfismo fue ASB17 con 18 alelos, cuatro de éstos de baja frecuencia (D, S, T y V) y, el menos polimórfico HTG4, con 7 alelos (Tabla 1).

Agrupando los 264 individuos en una sola población, se estimó que el locus con mayor heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e) fue ASB17, el de menor H_e y H_o fue HMS6 (Tabla 2). El locus HMS3 con ocho alelos mostró una diversidad genética alta 0,811. Las frecuencias alélicas de los seis marcadores indican que algunos alelos son los más frecuentes en la población (Tabla 2).

La comparación de la distribución alélica y genotípica entre los caballos criollos colombianos y los agrupados

Tabla 1. Frecuencias alélicas de seis microsatélites de la población de caballos colombianos.

Alelos	ASB17	AHT5	HMS6	HMS3	HTG4	AHT4
D	0,004					
E						
F	0,039					
G	0,009					
H	0,011		0,049			0,184
I	0,014	0,007		0,065		0,012
J	0,050	0,109				0,082
K	0,006	0,175	0,093		0,093	0,103
L	0,072	0,031	0,131		0,170	0,110
M	0,254	0,224	0,098	0,175	0,463	0,037
N	0,080	0,315	0,007	0,298	0,125	0,045
O	0,049	0,077	0,077	0,170	0,116	0,388
P	0,044	0,009	0,529	0,135	0,026	0,039
Q	0,073	0,054	0,016	0,127	0,007	
R	0,233			0,026		
S	0,003			0,002		
T	0,004					
U	0,054					
V	0,001					
Na	18	9	8	8	7	9
He	0,852	0,798	0,676	0,811	0,718	0,780
Ho	0,799	0,797	0,697	0,776	0,745	0,775

por FEDEQUINAS no mostró diferencias significativas ($P < 0,05$). La evaluación de la estructura de las poblaciones con los estadísticos F de Wright (Tabla 3) revelaron poca diferenciación genética ($F_{ST} = 0,0210$), con un intervalo de confianza entre $-0,00200$ y $0,06276$ estimado por bootstrapping, con una confianza del 95%; así mismo pusieron de manifiesto un bajo coeficiente de endogamia F_{IS} $0,011$. De otra forma, las distancias de Cavalli-Sforza (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967) para la pareja Cundinamarca-Fedequinas fue de $0,004$ y para la distancia de Nei (1987), fue de $0,098$.

El análisis de correspondencias múltiples (ACM) de las frecuencias alélicas obtenidas de los seis microsatélites en los caballos de Cundinamarca, con las calculadas por Rodas (2000), con 2668 equinos del occidente colombiano y con las obtenidas por Romero (2000) con 400 animales de diferentes zonas de Colombia, determinó que el 71% de la inercia total se ubica en el primer eje indicando un agrupamiento de las frecuencias alélicas por similitud en los seis loci en los tres estudios en distintas zonas de Colombia. De igual manera, los valores propios de los dos ejes son bajos ($0,108$ y $0,017$), todo lo anterior establece que no hay diferencias entre las poblaciones de caballos evaluadas.

Tabla 2. Frecuencia alélica de seis microsatélites de FEDEQUINAS y de los seis criaderos agrupados de Cundinamarca.

Alelos	FEDEQUINAS						CRIADEROS					
	ASB17	AHT5	HMS6	HMS3	HTG4	AHT4	ASB17	AHT5	HMS6	HMS3	HTG4	AHT4
D	0,002											
E												
F	0,045						0,013					
G	0,009						0,013					
H	0,010		0,048			0,183	0,009		0,053			0,189
I	0,006	0,006		0,063		0,010	0,018	0,009		0,079		0,022
J	0,058	0,110				0,081	0,053	0,105				0,088
K	0,005	0,168	0,091		0,094	0,105	0,009	0,206	0,105		0,088	0,092
L	0,028		0,128		0,167	0,109	0,009		0,145		0,189	0,114
M	0,290	0,007	0,098	0,183	0,470	0,036	0,289	0,145	0,101	0,136	0,430	0,044
N	0,091	0,196	0,007	0,024	0,122	0,042	0,075	0,360	0,009	0,035	0,140	0,061
O	0,041	0,352	0,081	0,323	0,116	0,395	0,026	0,132	0,057	0,345	0,114	0,355
P	0,047	0,092	0,536	0,136	0,027	0,039	0,088	0,004	0,496	0,132	0,022	0,035
Q	0,022	0,003	0,012	0,124	0,004		0,026	0,039	0,035	0,145	0,018	
R	0,271			0,136			0,325			0,105		
S	0,004	0,065		0,009						0,014		
T	0,005											
U	0,065						0,061					
V	0,001											

Tabla 3. Estimación de los estadísticos F para las poblaciones agrupadas FEDEQUINAS y criaderos.

Estadísticos F	Valor	Intervalos de Confianza 95%
F_{IS}	-0,0049	-0,02433 - 0,01154
F_{ST}	0,0233	-0,00048 - 0,06608
F_{IT}	0,0184	-0,02403 - 0,07068

Comparando los estudios efectuados en caballos colombianos sobre los indicadores de variabilidad genética, se encontró que el número promedio de alelos (NMA) fue semejante: en Rodas (2000) 10,25 alelos para 16 loci;

9,14 en Romero (2000) con 14 loci y en el presente estudio fueron 9,80 para seis loci. Adicionalmente, fueron similares los valores de heterocigocidad esperada y observada.

Se observa la inexistencia del equilibrio Hardy Weinberg en HMS3 ($P < 0,000$) y ASB17 ($p < 0,000$) y se determinó déficit de heterocigotos en HMS3, mientras que los demás loci estuvieron en equilibrio. Las parejas en desequilibrio de ligamiento fueron HMS3 - ASB17 (0,003) y AHT5 – ASB17 (0,003) con una valor de significancia ($p < 0,05$).

El contenido de información polimórfica (PIC) varió desde 0,799 para ASB17 a 0,679 en HMS6 y el PIC medio fue de 0,743. La probabilidad de exclusión fue mayor para el locus ASB17 y la menor para los loci HTG4 y HMS6, la probabilidad de exclusión acumulada (PEA) de los seis loci fue de 0,954, lo que significa que de 1000 individuos tomados al azar 9540 equinos son excluidos de ser el padre correctamente (Tabla 4).

Tabla 4. Índice F por loci, contenido de información polimórfica y probabilidad de exclusión.

	ASB17	HMS6	HMS3	HTG4	AHT4	AHT5	Total
F	0,064	-0,031	0,044	-0,037	0,009	0,002	0,011
PE	0,434	0,347	0,450	0,347	0,452	0,397	0,954
PIC	0,799	0,694	0,791	0,684	0,751	0,756	0,743

F- Índices de fijación. PIC contenido de información polimórfica. PE Probabilidad de exclusión

Los equinos de Cundinamarca representan a la población equina colombiana que esta constituida por las razas caballo criollo colombiano, paso fino colombiano y trocha pura colombiana. La población colombiana de caballos es homogénea por ser genéticamente similar en las diferentes regiones y altamente variable en los seis microsatélites estudiados, con una heterocigocidad observada H_o 0,65, levemente inferior a la diversidad genética H_e 0,773.

El desequilibrio Hardy-Weinberg, se explica por la sustitución de una base en la secuencia flanqueante del marcador HMS3 descrito por (Achmann *et al.* 2001) y su efecto es de homocigocidad. Esta reducción calculada de heterocigotos es errada e introducida por la falla en la amplificación del marcador HMS3. Esta misma condición logra explicar la asociación estadística detectada el desequilibrio de ligamiento con este marcador.

Las distancias genéticas y los estadísticos F de Wright pusieron de manifiesto que los caballos que se agrupan en FEDEQUINAS (paso fino y el caballo de trocha) y los caballos criollos evaluados de Cundinamarca conforman una misma población. El F_{ST} 2,32% ratifica la similaridad por la escasa diferenciación genética entre las agrupa-

ciones, mientras que los análisis de varianza a nivel de los individuos, con respecto a cada agrupación y a la población total (F_{IS} y F_{IT}), son bastante bajos (Tabla 3). Indicando que la endogamia en la población es muy baja, con escasa diferenciación genética, sin afectar la variabilidad genética.

Los resultados muestran que la población de caballos colombianos es una sola e indica una variación genética relativamente alta estimada por la diversidad genética y la heterocigocidad observada. Comparando la variabilidad genética calculada de cuatro microsatélites con el Caballo Uruguayo (Kelly *et al.* 2002), los equinos colombianos tienen una variabilidad levemente superior en el número de alelos, en la heterocigocidad observada y en la diversidad genética. Cotejando la diversidad genética obtenida en los caballos colombianos con la obtenida en las razas españolas fundadoras, como el Lusitano $H_e = 0,735$ (Luis *et al.* 2006), y razas gallegas 0,750 (Cañon *et al.* 2000), los equinos en Colombia mantienen la diversidad genética, la cual, se ha podido dar por diferentes motivos. Estos son: primero porque la dispersión de caballos hacia América es reciente, aproximadamente cinco siglos atrás; segundo, por la multiplicidad de orígenes geográficos de las razas espa-

ñolas; tercero, por los niveles bajos de selección artificial entre las razas equinas y cuarto, por la influencia de los factores demográficos, como el mantenimiento de los animales en las áreas tradicionalmente dispuestas y poco uso en labores del campo.

Así mismo, la variabilidad genética es similar también a la de otras razas equinas europeas, como el caballo Noruego (Bjornstad *et al.* 2000). Sin embargo es superior cuando se compara con razas equinas que padecen un manejo reproductivo aislado y tienen barreras geográficas, como en los caballos salvajes Przewalski (Aberle *et al.* 2004), Lippizzian (Achman *et al.* 2004) y semi silvestres, como Menorquina, Jaca, Navarra (Glazko, 1998; Solís *et al.* 2005), los cuales tienen bajo polimorfismo y baja variabilidad genética.

Los microsatélites HTG4 y HMS6 son inadecuados para las pruebas de filiación por su baja probabilidad de exclusión (PE), por lo cual se deben usar un mayor número de microsatélites y más polimórficos para aumentar la PEA, como lo efectuado en otras razas equinas (Tozaki *et al.* 2003; Kakoi *et al.* 1998; Meriaux *et al.* 1998) y otras especies (Giovambattista *et al.* 2001; Stahlberger-Saitbekova *et al.* 2001; Luikart *et al.* 1999) y así ser útiles en las pruebas de filiación.

La divergencia entre los genomas de los animales domésticos y el uso microsatélites altamente polimórficos ha permitido la identificación y la asignación de raza en diferentes especies, como los bovinos (MacHugh *et al.* 1998), los ovinos (Buchanan *et al.* 1994) y en algunas razas equinas (Bjornstad & Roed, 2001). Para las razas equinas colombianas la asignación por raza con seis microsatélites no es posible por ser genéticamente homogéneas, sin embargo, aumentar el número de marcadores podría mejorar el poder de discriminación entre las razas colombianas.

CONCLUSIONES

El uso de los microsatélites recomendados por la FAO para la caracterización genética permitió evaluar y comparar la diversidad genética de los caballos colombianos con otras razas, como las que han influido en la formación de las razas colombianas. Este estudio muestra un análisis genético de seis marcadores en la raza de caballos criollos colombianos con morfología y con

características de producción similares. De igual manera, se determinó que las razas equinas colombianas, conformadas por los caballos criollos colombianos, el paso fino colombiano y los caballos trocha colombiana, no se diferencian genéticamente entre ellas, conformando una sola población equina. La variación genética de los caballos colombianos integrados por las tres razas antes mencionadas es alta comparada con otras razas equinas y no hay pérdida de la variabilidad genética.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Beatriz Salgado por el suministro de los datos de FEDEQUINAS. El estudio fue soportado por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA).

BIBLIOGRAFÍA

- ACHMANN, R.; CURIK, I.; DOVC, P.; KAVAR, T.; BODO, I.; HABE, F.; MARTI, E.; SÖLKNER, J.; BREM, G. 2004. Microsatellite diversity, population subdivision and gene flow in the Lipizzan horse. *Animal Genetics*. 35:285-292.
- ACHMANN, R.; HÜBER, T.; WALLNER, B.; DOVC, P.; MÜLLER, M.; BREM, G. 2001. Base substitutions in the sequences flanking microsatellite markers HMS3 and ASB2 interfere with parentage testing in the Lipizzan horse. *Animal Genetics* 32:52.
- ABERLE, K.S.; HAMANN, H.; DRÖGEMÜLLER, C.; DISTL, O. 2004. Genetic diversity in German draught horse breeds compared with a group of primitive, riding and wild horses by means of microsatellite DNA markers. *Animal Genetics* 35:270-277.
- BELKHIR, K. 2003. DetSel 1.0: a computer program to detect markers responding to selection. *J. Hered.* 94(5):429-431.
- BELKHIR, K.; BORSA, P.; GOUDET, J.; CHIKHI, L.; BONHOMME, F. 2000. GENETIX 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions: CNRS/UPR. 9060. Université de Montpellier II, Montpellier, France.

- BINNS, MM.; HOLMES, NG.; HOLLIMAN, A.; SCOTT, AM. 1995. The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in Thoroughbred parentage testing. *British Vet. J.* 151:9-15.
- BJORNSTAND, G.; GUNNBY, E.; ROED, K.H. 2000. Genetic structure of Norwegian horse breeds. *J. Animal Breeding and Genetics* 117:307-317.
- BJORNSTAND, G.; ROED, K.H. 2001. Breed demarcation and potential for breed allocation of horses assessed by microsatellite markers. *Animal Genetics.* 32:59-65.
- BOWLING, AT. 1997 *Horse Genetics*. Eds. CAB International Oxford UK. p.45-58.
- BUCHANAN, F.C.; ADAMS, L.J.; LITTLEJOHN, R.P.; MADDOX, J.F.; CRAWFORD, A.M. 1994. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics* 22: 397-403.
- CAÑON, J.; CHECA, M.; CARLEOS, C.; VEGA-PLA, J.L.; VALLEJO, M.; DUNNER, S. 2000. The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Animal Genetics.*31:39-48.
- CARRINGTON, M.; MARTI, D.; WADE, J.; KLITZ, W.; BARCELLOS, L.; THOMPSON, G.; CHEN, J.; TRUEDSSON, L.; STURFELT, G. 1999. Microsatellite markers in complex disease: Mapping disease-associated regions within the human major histocompatibility complex. En: OXFORD Univ. Press. *Microsatellites: Evolution and Applications*. p.225-236.
- CAVALLI-SFORZA, L.L.; EDWARDS, A.W.F. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Am. J. Human Genetics* 19:233-257.
- CHIKHI, L.; GOOSSENS, B.; TREANOR, A.; BRUFORD, M.W. 2004. Population genetic structure of and inbreeding in an insular cattle breed, the Jersey, and its implications for genetic resource management. *Heredity.* 92:396-401.
- CHO, G.J.; CHO, B.W. 2003. Validation of microsatellite markers for routine canine parentage testing in Korea. *Korean J. Genet.* 25:103-108.
- ELLEGREN, H.; ANDERSSON, L.; JOHANSSON, M.; SANDBERG, K. 1992. DNA fingerprint in horses using simple (TG)_n probe and its application to population comparisons. *Animal Genetics.* 23:1-9.
- ESTRADA, L.R. 1995. Los caballos criollos colombianos también tienen historia. *Revista Fedequinas.* 2:56-60.
- FAO (Organización para la Agricultura y la Alimentación). 1997. The global strategy for the management of Farm Animal Genetic Resources: A call for action. FAO. Publishing Rome. p.10-13
- FAO (Organización para la Agricultura y la Alimentación). 2004. Domestic Animals Diversity, Disponible desde Internet en: <http://www.fao.org/dad.is/> (con acceso 10/02/05).
- FERNÁNDEZ, J.; TORO, M.; CABALLERO, A. 2004. Managing individuals' contributions to maximize the allelic diversity maintained in small, conserved populations. *Conservation Biology.* 18(5):1358-1367
- GIOVAMBATTISTA, G.; RIPOLI, M.V.; LIRON, J.P.; VILLEGAS-CASTAGNASSO, E.E.; PERAL-GARCIA, P.; LOJO, M.M. 2001. DNA typing in a cattle stealing case. *J. Forensic Sci.* 46(6):1484-1486.
- GLAZKO, M. 1998 XXVIth International Conference on Animal Genetics. Auckland, NZ. Section A. p.25.
- GLOWATZKI-MULLIS, M.L.; GAILLARD, C.; WIGGER, G.; FEIES, R. 1995. Microsatellite-based parentage control in cattle. *Anim Genet.* 26, 7-12.
- GOUDET, J. 2001. Disponible desde Internet en: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html> (con acceso 07/03/05).
- HANCOCK, J.M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. En: Goldstein, D.B.; Schlötterer, C. edits. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford Univ. Press. p.1-23.

- HERRERA, J.; NAVARRETE, A. 1978. Descripción y evaluación de las características raciales del caballo criollo. Tesis de grado. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. p.54-62.
- INTERNATIONAL SOCIETY ANIMAL SCIENCES (ISAG). 1996. M values and Chromosomes Assignments for STRs Reported by VGL. Veterinary Genetic Laboratory, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA. Disponible desde Internet en: <http://www.vgl.ucdavis.edu/~lvmillon/mvalues.html> (con acceso 15/05/05).
- KELLY, L.; POSTIGLIONI, D.F.; DEANDRÈS, D.F.; VEGA-PLA, GAGLIARDI, R.; BIAGETTI, R.; FRANCO, J. 2002. Genetic haracterization of the Uruguayan creole horses and analysis of relationships among horse breeds. *Res. Vet. Sci.* 72:69-73.
- KAKOI, T.; TOZAKI, S.; HIROTA, K. 1998. Evaluation of a new microsatellite markers for horse parentage testing. XXVIth International Conference on Animal Genetics. Auckland, NZ. Section A. p.24.
- KAVAR, T.; HABE, F.; BREM, G.; DOVC, P. 1999. Mitochondrial D-loop sequence variation among the 16 maternal lines of the Lipizzan horse breed. *Animal Genetics.* 30:423-430.
- LUIS, C.; BASTOS-SILVEIRA, C.; COTHRAN, E.G.; MAR-OOM, M. 2006. Iberian Origins of New World Horse Breeds. *J. Hered.* 97(2):107-113.
- LUIKART, G.; BIJU-DUVAL, M-P.; ERTUGRUL, O.; ZAGDSUREN, Y.; MAUDET, C.; P TABERLET. 1999. Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus*). *Animal Genetics.* 30(6):431-437.
- MACHUGH. D.E.; LOFTUS. R.T.; CUNNINGHAM. P.; BRADLEY. D.G. 1998 Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Animal Genetics.* 29:333-340.
- MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRÚK, L.; PEMBERTON, JM. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations *Molecular Ecology.* 7(5):639-655.
- MERIAUX. J.; ROGNON. R.; MAHLA. R.; OURAGH. L.; BOSCHER. M. 1998. Usefulness of microsatellite markers for parentage control and phylogenetic relationships in French and Moroccan horse breeds. XXVIth International Conference on Animal Genetics. Auckland, NZ. Section A. p.25.
- MIROL, P.; PERAL-GARCÍA, J.L.; VEGA-PLA F.; DULOIT, N. 2002. Phylogenetic relationships of argentin-ean creole horses and other South American and Spanish breeds inferred from mitochondrial DNA sequences. *Animal Genetics.* 33:356-363.
- MVSP (MULTIVARIATE STATISTICAL PACKAGE) 3.1. Disponible desde en Internet en: <http://www.kovcomp.com/> (con acceso 7/4/06).
- NEI, M. 1987 *Molecular Evolutionary Genetics.* Columbia University Press, NY.p.238-256.
- RAYMOND M.; ROUSSET F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86:248-249.
- RODAS, A. 2000. Variabilidad genética poblacional en equinos colombianos mediante microsatélites. Trabajo de grado Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. p.60-78.
- RODERO, A.; DELGADO, J.V.; RODERO, E. 1992 Primitive andalusian livestock and their implications in the discovery of America. *Arch. Zootec.* 41(154):383-400.
- ROMERO, M. 2000. Caracterización de la constitución genética de la población de caballos criollos colombiano mediante el estudio de frecuencias de marcadores microsatélites STRs. Trabajo de grado Biología. Universidad Industrial de Santander. p.35-50.
- RON, M.; BLANC, Y.; BAND, M.; EZRA, E.; WELLER, J.I. 1996. Misidentification Rate in the Israeli Dairy Cattle Population and Its Implications for Genetic Improvement. *J. Dairy Sci.* 79(4):676-681.
- RUIZ-GARCÍA, M.; TERWENGEL, PO.; PAYÁN, E.; CASTELLANOS, A. 2003. Genética molecular de

- poblaciones aplicada al estudio de dos grandes carnívoros neotropicales (*Tremarctos ornatus* Cuvier, 1825-Oso Andino y *Panthera onca* Linné, 1758-Jaguar): lecciones de conservación. Bol. Real Soc. Española de Historia Natural. Sección Biológica. 98:135-158.
- SOLIS, A.; JUGO, B.M.; MÉRIAUX, J.C.; IRIONDO, M.; MAZÓN, J.I.; AGUIRRE, A.I.; VICARIO, A.; ESTOMBA, A. 2005. Genetic diversity within and among four south european native horse breeds based on microsatellite DNA analysis: Implications for conservation. J. Hered. 96(6):670-678.
- STAHLBERGER-SAITBEKOVA, N.; SCHLÄPFER, J.; DOLF G.; GAILLARD, C. 2001 Genetic relationships in Swiss sheep breeds based on microsatellite analysis. J. Anim. Breeding Genetics. 118(6):379-387.
- TOZAKI, T.; TAKEZAKI, N.; HASEGAWA, T.; ISHIDA, N.; KUROSAWA, M.; TOMITA, M.; SAITOU, N.; MIKUYAMA, H. 2003. Microsatellite variation in Japanese and Asian horses and their phylogenetic relationship using a European horse outgroup. J. Hered. 94(5):374-80
- TOZAKI, T.; KAHOI, H.; MASHIMA, S.; HIROTA, K.; HASEGAWA, T.; ISHIDA, N.; MIURA, N.; CHOI-MIURA, N.; TOMITA, M. 2001 Population study and validation of paternity testing for thoroughbred horses by 15 microsatellite loci. J. Vet. Med. Sci. 63(11):1191-1197.
- VIRGÜEZ, F. 2004. Aproximación a la caracterización morfológica y fenotípica del caballo criollo de paso Colombiano. Tesis de grado. Universidad Nacional Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Bogotá. p.41-45.
- VIVAS, H. 1994. Evaluación de los problemas de aplomos en los caballos de paso fino de la Sabana de Bogotá. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Bogotá. p.34-47.
- WEBER, J.L.; MAY, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am. J. Hum. Genet. 44, 388-396.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C. 1984. Estimating F statistics for the analysis of population structure. Evolution 38:1358-1370.
- WOMACK, J.E. 2005. Advances in livestock genomics: Opening the barn door. Genome Research. 15(12):1699-1705.
- ZABEK, T.; NOGAJ, A.; RADKO, A.; NOGAJ, J.; SLOTA, E. 2005. Genetic variation of Polish endangered Bilgoraj horses and two common horse breeds in microsatellite loci. J. Appl. Genet. 46(3):299-330.

Recibido: Octubre 30 de 2006

Aceptado: Abril 23 de 2007

EVALUACIÓN DE DOS ADYUVANTES EN LA FORMULACIÓN DE UNA VACUNA ANTITETÁNICA

EVALUATION OF TWO ADJUVANTS FOR THE FORMULATION OF ANTITETANIC VACCINES

Janeth del C. Arias ¹
Diana C. Sánchez ¹
Mery C. Vásquez C. ¹
Cindy M. Fernández ¹
Luz Marina Parra ²

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue el de comparar el comportamiento de dos adyuvantes, hidróxido de aluminio y fosfato de calcio, con dos lotes diferentes de toxoide tetánico, uno producido por cultivo agitado y el otro producido por cultivo estático. Fue evaluada la respuesta inmune generada a través de la prueba de potencia del National Institute of Health (NIH) para garantizar el cumplimiento de los estándares establecidos para la prueba de potencia, en la cual se postula que la respuesta inmune generada debe ser como mínimo de 2UI/mL. Los resultados muestran que el aluminio presenta títulos más altos en la mayoría de los casos y en otros no se aprecia una diferencia significativa entre los dos adyuvantes. También se observó claramente que cualquiera de los dos adyuvantes genera una mejor respuesta inmune con el lote 69 (cultivo estático) que con el lote 11 (cultivo agitado). El análisis de varianza arroja un error de $p < 0,002$.

Palabras clave: Tétano, adyuvante, fosfato de calcio, hidróxido de aluminio, límite floculante

SUMMARY

The objective of this research was to compare the role of two adjuvants, aluminum hydroxide and calcium phosphate, with two different tetanus toxoid batches, one obtained by stationary culture and the other one by submerged culture. The generated immune response was evaluated through the potency assay of the National Institute of Health (NIH), which states that in order to guaranty that the vaccines are within the established standards the immune response has to be at least 2UI/mL. The results indicate that aluminum hydroxide presents in most cases better titers, while in other cases no significant difference was found. Results showed also, that both adjuvants gave a better immune response with batch 69 (static culture) than with batch 11 (sumerged culture). The variance analysis showed an error of $p < 0.002$.

Key words: Tetanus, adjuvant, calcium phosphate, aluminum hydroxide, flocculent limit.

INTRODUCCIÓN

El hidróxido de aluminio, el aluminio fosfato y el fosfato de calcio han sido hasta el momento los adyuvantes

¹ Grupo Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Dirección para Correspondencia Carrera 7 No. 43-82 Edificio Félix Restrepo. Bogotá-Colombia. Correspondiente autor: jdcarias@javeriana.edu.co, cinfo7@yahoo.com.

² Instituto Nacional de Salud. Subdirección Industrial. Laboratorio de Tétanos. imparra@ins.gov.co.

aceptados por la Farmacopea Europea para vacunas humanas. Sin embargo, los adyuvantes que contienen aluminio están siendo reevaluados, ya que se ha demostrado la existencia de efectos adversos para los pacientes (Gupta & Relyveld, 1991). La discusión sobre estas reacciones indica que el aluminio ha sido asociado a dolores, nódulos subcutáneos, formación de granulomas e inclusive desórdenes del sistema nervioso, como demencia de Alzheimer y sclerosis lateral amiotrófica. Todo esto se debe a la acumulación lenta de residuos de aluminio. Se plantea entonces que, como el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, es un constituyente normal del cuerpo humano, probablemente produzca menos o ninguna reacción adversa.

Entre 1986 y 1991, se registraron 1.800.000 episodios de tétanos al nivel mundial, de los cuales 1.200.000 resultaron mortales, poniendo de relieve la importancia de su tratamiento y su erradicación. El tratamiento, se realiza por inmunización tanto pasiva como activa. En Colombia, el Instituto Nacional de Salud (INS, 1998), estaba encargado de la producción de la vacuna tetánica en sus tres presentaciones (Td, DPT y TT), siguiendo los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Barreto, 2000). El INS obtenía el toxoide tetánico a partir de cultivos sumergidos estacionarios de *Clostridium tetani* en jarros de vidrio de 60L, utilizando el medio y los procedimientos sugeridos por Latham et al. (1962).

La enfermedad tiene distribución mundial, pero su foco es en áreas tropicales y en países en vías de desarrollo. Las características ecológicas propicias para el bacilo tetánico y las condiciones de higiene y sanidad favorecen que se presente con mayor frecuencia en las zonas rurales que en las urbanas. A pesar de ser una enfermedad previsible por vacunación, en los países en vías de desarrollo, entre ellos Colombia, muchas madres, no inmunizadas, dan a luz niños a quienes no se cuida en forma apropiada el cordón umbilical, por lo cual, el tétanos neonatal tiene un impacto significativo.

Aunque, se han publicado reportes de estudios de producción de toxina tetánica en fermentadores agitados a escala industrial, la carencia de instalaciones condujo a que el INS mantuviera la tecnología de cultivos estáticos. Aunque la tecnología de cultivo estático es sencilla, implica considerable manipulación, altos riesgos de contaminación tanto para el operario como para

el cultivo, costos elevados, aumento de factores que conllevan a variaciones entre lote y lote y la dificultad de escalamiento de la producción (U.S. Health Human Services, 2003). Adicionalmente, la producción no alcanza a cubrir las necesidades de la población colombiana, obligando a importar una parte de la vacuna necesaria en los procesos de inmunización preventiva al nivel nacional. Por todas estas razones, el INS detuvo la producción de la vacuna, dejando vía libre solo para la importación. Sin embargo, por la bien conocida crisis nacional, no se ha importado lo suficiente para la demanda, lo que hoy nos coloca en emergencia sanitaria. De aquí la urgencia y la importancia de reactivar la producción de la vacuna.

Si bien el 80% de los niños de todo el mundo en 1994 estaban vacunados contra el tétanos (con la vacuna DPT) durante su primer año de vida, más del 50% de los lactantes nacían sin protección contra la enfermedad porque sus madres no estaban vacunadas con el toxoide tetánico (OMS, 1997).

Definición y función de los adyuvantes: Un adyuvante inmunógeno puede ser definido como cualquier sustancia que incorporada a una vacuna, acelera, prolonga o potencia la respuesta inmunogénica frente a la misma. Son sustancias o preparados químicos que se incorporan al antígeno o inyectados simultáneamente con él y que hacen más efectiva la respuesta inmune. Con su empleo, se logra una economía de antígeno y de tiempo, así como un mayor nivel de anticuerpos específicos (Roitt, 1991).

Tienen gran importancia y se diferencian de las proteínas transportadoras o "carriers" (proteínas extrañas que se unen a un antígeno no inmunógeno para convertirlo en inmunógeno), en que no forman uniones estables con el inmunógeno. Los adyuvantes son básicamente necesarios en la inmunización inicial, mientras que los portadores, se necesitan tanto en la respuesta primaria como en las sucesivas. La mayoría de las nuevas vacunas compuestas por subunidades antigénicas altamente purificadas son muy seguras pero de menor inmunogenicidad que otras vacunas con más impurezas. Esta inmunogenicidad puede ser potenciada por los adyuvantes. La utilización de estos compuestos tiene como ventajas: a) inmunización eficaz de personas con capacidad inmune disminuida, como neonatos, ancianos y personas inmunodeprimidas; b) elaboración de

vacunas con menos cantidad de antígeno y, por tanto, más aptas para crear vacunas combinadas y, c) menor número de dosis de refuerzo (Roitt, 1991).

El mecanismo de acción de estas sustancias ha sido objeto de numerosos estudios y, al parecer, existen diversos factores que explican su modo de acción. El antígeno libre normalmente se difunde con mucha rapidez desde los tejidos locales que rodean el sitio de inoculación, y una de sus funciones importantes es crear un reservorio o depósito del antígeno de larga vida. Las investigaciones realizadas han demostrado que virtualmente todos los adyuvantes activan o estimulan los macrófagos (Guerrero & Gattas, 1982); cuando son activados estimulan la respuesta inmune por un incremento de la cantidad de antígeno expresado en la membrana celular y de la eficiencia de su presentación a los linfocitos. El macrófago también libera factores solubles estimulantes que amplifican la proliferación de los linfocitos (Wagnerová & Ferencik, 1993). Por otro lado, algunos adyuvantes poseen la capacidad de actuar específicamente sobre los linfocitos, pero, en general, éstas funcionan mejor si facilitan la liberación simultánea del antígeno y de sustancias inmunomoduladoras al tejido linfoide (Bennet *et al.* 1992).

Tipos de adyuvantes: La búsqueda de nuevas sustancias con actividad adyuvante/inmunopotenciadora comprende una de las tendencias más importantes en la investigación inmunológica actual. Las sustancias inmunomoduladoras constituyen una familia muy heterogénea si se toma en consideración su origen, su naturaleza química y su actividad biológica específica (Takx-Kohlen, 1992). Los agentes inmunopotenciadores (adyuvantes) son la directriz del esfuerzo investigativo sostenido para hallar sustancias con actividad de adyuvantes, eficaces en la estimulación de la respuesta inmune y desprovistas de propiedades biológicas adversas (Stewart-Tull, 1989). Son importantes, ya que contribuyen a que las respuestas en animales de experimentación sean mayores, especialmente en aquellos casos en los que son empleados durante la producción de sueros hiperinmunes (Azuma, 1992).

De acuerdo a Guerrero & Gattas (1982), entre los adyuvantes más importantes figuran:

- **Alúmina:** sales insolubles de sulfato aluminico-potásico y actúa mediante varios mecanismos, tales como

1.- Precipita el antígeno. Al inyectarse va liberando el antígeno lentamente, con lo que se suministra un estímulo persistente (el Ag dura varios días en el lugar donde se inoculó). 2.- El Ag precipitado tiene mayor tamaño, por lo que puede ser fagocitado más fácilmente y, por lo tanto, es presentado más efectivamente, y 3.- Inducción de granulomas.

- **Adyuvantes de Freund:** el adyuvante incompleto de Freund consiste en una solución acuosa con el Ag, junto con aceite mineral y un agente dispersante (el manoleato). El adyuvante completo de Freund (FCA) incorpora además una suspensión de *Mycobacterium* muertos por calor. Ambos liberan lentamente el Ag, logrando un estímulo persistente. El macrófago aumenta en su superficie el número de moléculas B7, lo que facilita su interacción con el receptor CD28 del linfocito T_H . Esto suministra la llamada señal coestimuladora, que potencia la interacción entre MHC (del macrófago), Ag procesado y TCR (receptor de la célula T). Además, el completo es más potente porque suministra muramil-dipéptidos de la pared celular de las micobacterias, ello permite una buena activación de macrófagos, que liberan la citoquina IL-1, que a su vez activa a los linfocitos T_H . El completo induce mejor los granulomas que corresponden una infiltración celular, con una masa densa y rica en macrófagos, con lo que se mejora el procesamiento y la presentación del Ag. Se provoca una buena liberación de IL-1 de los macrófagos, que activan a los linfocitos T_H (Guerrero & Gatta, 1982).
- **Polirribonucleótidos sintéticos:** estimulan la proliferación inespecífica de linfocitos (Guerrero & Gattas, 1982)
- **Lipopolisacárido bacteriano (LPS):** igual efecto que el anterior. Recientemente se están ensayando los liposomas: el antígeno se encierra en liposomas o se une a la bicapa lipídica de este tipo de vesículas membranosas (Roitt, 1991)
- **Compuestos de Aluminio:** En la actualidad, los únicos adyuvantes que se utilizan son los compuestos de aluminio (hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio). El ión aluminio genera exclusivamente respuestas de linfocitos T ayudadores (T_H2), siendo muy útiles cuando se quieren obtener títulos de anticuerpos muy

elevados, que neutralicen toxinas (los toxoides tetánico y diftérico) o virus, antes de que se adhieran al receptor celular (vacuna de hepatitis) (Roitt, 1991).

- **Otros Adyuvantes:** Existen otros adyuvantes con propiedades muy interesantes, algunos de los cuales están en fase de evaluación, como componentes bacterianos naturales o sintéticos (lípidos A de las endotoxinas bacterianas y dipéptidos de muramilo); adyuvantes particulados, (complejos inmunoestimulantes, liposomas y bioesferas degradables); emulsiones oleosas, (saponinas y escualenos) y otros adyuvantes sintéticos, como los copolímeros de bloqueo no-iónico (Spriggs & Koff, 1991).

Mecanismos de acción de los adyuvantes: Los adyuvantes, en general, actúan mediante tres mecanismos (Takx-Kohlen, 1992):

- “Efecto depot”, por el que los adyuvantes de aluminio, las emulsiones oleosas y los liposomas o microsferas mantienen al antígeno atrapado en el sitio de la administración de la vacuna, permitiendo un estímulo inmune prolongado. Este efecto es particularmente importante cuando se utilizan pequeños antígenos solubles que podrían ser aclarados rápidamente. Además, el mismo “efecto depot” impide una liberación masiva del antígeno, que podría dar lugar a tolerancia inmune, y causar una respuesta inflamatoria local que atrae a macrófagos y a otras células presentadoras de antígenos.
- Mejorar la presentación del antígeno a las células APC (Células Presentadoras de Antígenos) y actuando como coestimuladores de los macrófagos, como en el caso de los iones de aluminio, liposomas y copolímeros de bloqueo no-iónico.
- Induciendo la secreción de citocinas que actúan sobre los linfocitos T y B.

Adyuvantes como los péptidos de muramilo vehiculizados en aceite, el lípido A de las endotoxinas y el adyuvante completo de Freund estimulan preferentemente respuestas T_H1 , que dan lugar a citotoxicidad. En el mismo sentido, las saponinas, los complejos estimulantes inmunes y los liposomas, desencadenan respuestas citotóxicas aptas para destruir virus u otros organismos intracelulares (Takx-Kohlen, 1992).

Los adyuvantes derivados de las bacterias, como el lípido A y los péptidos de muramilo de la pared celular son muy potentes. Se ha postulado que sería debido a su reconocimiento por receptores de las células presentadoras de antígeno, cuya función es reconocer estructuras de bacterias, que se hayan conservado a lo largo de la evolución filogenética (Takx-Kohlen, 1992).

Algunas citocinas podrían ser utilizadas como adyuvantes, dada su capacidad para favorecer respuestas T_H1 o T_H2 . Han sido utilizados para lograr respuestas a la vacuna de hepatitis B en personas que no desarrollan anticuerpos frente a la misma. Sin embargo, el uso de citocinas, como adyuvantes, se puede ver dificultado por las numerosas e imprevistas acciones de estos mediadores en el sistema inmune. La elección de un adyuvante determinado en la elaboración de una vacuna, depende de la naturaleza de ésta, del efecto deseado y de esto dependerá la efectividad de la vacuna (Takx-Kohlen, 1992).

Futuro de los adyuvantes: Las propiedades inmunomoduladoras han sido demostradas en numerosos polisacáridos naturales y algunos derivados obtenidos por hidrólisis o modificación química. La actividad estimulante de la hematopoyesis y de la respuesta inmune humoral y celular es uno de los rasgos más significativos de los glucanos aislados de la pared celular de levaduras (Diluzio, 1985). Ha sido mostrado que la administración simultánea del glucano y un antígeno estimula la formación de anticuerpos específicos contra el antígeno en cuestión; prueba de ello es la estimulación por los glucanos de la respuesta humoral y mediada por células contra *Francisella tularensis* y *Pseudomonas pseudomallei* (Reynolds *et al.* 1980).

El objetivo de esta investigación fue comparar el comportamiento de los dos adyuvantes, hidróxido de aluminio y fosfato de calcio utilizando dos lotes diferentes de toxoide tetánico, uno producido por cultivo agitado y el otro producido por cultivo estático. La comparación fue evaluada mediante la respuesta inmune generada a través de la prueba de potencia del National Institute of Health (NIH), de tal forma que garantice el cumplimiento de los estándares establecidos para la prueba de potencia, donde se postula que la respuesta inmune generada debe ser mínimo de 2UI/mL. También se buscó el mejor adyuvante frente a la respuesta inmune generada y la relación existente entre el método de producción y la respuesta inmune.

MATERIALES Y MÉTODOS

Vacunas: Doce vacunas, todas diferentes, fueron preparadas de acuerdo a las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM). Para la preparación de estas vacunas, se utilizó un lote de toxina producido por cultivo agitado (11) y un lote de toxina producido por cultivo estático (69) facilitados por el Instituto Nacional de Salud (INS). De cada lote, se formularon seis vacunas, de las cuales tres se adsorbieron en $\text{Al}(\text{OH})_3$, en una concentración por vacuna ($<1,25\text{mg/mL}$) y las otras tres restantes se adsorbieron en $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, en una concentración por vacuna ($<1,3\text{mg/mL}$). Cada vacuna llevó como agente conservador Timerosal al 1% en una concentración por vacuna ($<0,022\%$) y se diluyó en solución salina tamponada pH 7,2. Cada una de las doce vacunas, se sometieron a las pruebas de control de calidad exigidas por el registro de producción de vacuna antitetánica adsorbida del INS (INS, 1995).

Prueba de Potencia: Se utilizó el método de potencia del National Institute of Health (NIH), donde la inmunización se hace en cobayos cepa Hartley y el desafío se realiza con ratones cepa NIH. El análisis de la potencia se realiza por el método estadístico de Spearman & Karber. Para cada una de las doce vacunas, se realizó la prueba de potencia por triplicado, para hacer el estudio estadísticamente representativo.

Inmunización: Para la inmunización, se utilizaron 18 cobayos Cepa Hartley con un peso entre 350 - 450g por cada vacuna, cada uno con la mitad de la dosis humana inmunizante (1,5mL) por vía intraperitoneal. La inmunización dura 45 días durante los cuales se pesan los animales semanalmente para verificar que no presentan efectos adversos y que suban de peso.

Sangría: Se anestesia cada cobayo con Ketamina (50mg/mL) y Seton (20mg Xilacina/mL). Posteriormente, se colectó por punción cardíaca 10mL de sangre de cada animal. Los tubos se incubaron a 4°C por 24h. Se centrifugaron a 4000 r.p.m. por 15 minutos y se extrajo el suero con pipeta en tubos secos, luego, se midió el volumen de suero del tubo que contenía menos cantidad del mismo y con este volumen se realizó un pool de suero.

Titulación del Suero: Se realizaron cuatro diluciones a una actividad supuesta de 2, 4, 8 y 16UI, con un factor

de dilución de dos para cada muestra. Para el control de la prueba, se utilizó una antitoxina de referencia obtenida del Instituto Butantan, Sao Paulo, Brasil, titulada a 1UI, con la cual se realizó cuatro diluciones a un título supuesto de 0,69; 0,83; 1,0 y 1,20 UI, con un factor de dilución de 1,2.

A cada tubo, tanto de control como de muestra, se le adicionó un volumen constante de toxina tetánica patrón (Butantan), titulada a 1UI, de tal manera que el volumen inoculado por animal contenía una dosis L+/10. Todos los tubos se agitaron e incubaron a 37°C por 45 minutos e inmediatamente se inocula 0,5mL de la mezcla por vía subcutánea, a seis ratones, cepa NIH, por tubo de mezcla. Los animales, se observaron diariamente por un período de 96 horas y se registró la mortalidad. Los resultados, se procesaron por el método estadístico de Spearman & Karber, para informar la potencia en UI/mL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prueba de potencia, se realizó en tres pasos básicos: Inmunización, Sangría y Titulación de sueros, según el Procedimiento Operativo Estándar del Laboratorio de Tétanos del INS (1995). Los resultados de la actividad inmunogénica, para cada vacuna, se observan en la Tabla 1. Se evidencia que el aluminio presenta títulos más altos en algunos casos y en otros no se aprecia una diferencia significativa. También, se nota claramente que cualquiera de los dos adyuvantes genera una mejor respuesta inmune con el lote 69 (cultivo estático) que con el lote 11 (cultivo agitado).

El análisis estadístico, se realizó con la prueba de Scheffe, que permitió identificar cuál nivel del adyuvante de cada ensayo hace rechazar la hipótesis de trabajo, el ANOVA arrojó un error de ($p<0,002$). En la Tabla 2, al observar los números de Scheffe, se evidencia que no existe una gran diferencia entre los dos adyuvantes, por ende se rechaza la hipótesis nula y determinar que para esta variable cada uno de los adyuvantes tiene un comportamiento diferente en cuanto a la variable respuesta (respuesta inmunogénica) y no tiene ninguna similitud en los datos.

En la Gráfica 1 se muestra el comportamiento de los dos adyuvantes frente a la respuesta inmunogénica,

Tabla 1: Resultados de la prueba de potencia de cada vacuna.

LOTE	Adyuvante	Vacuna 1	Vacuna 2	Vacuna 3	Antitoxina de Referencia
11		1A 1,4142 UI	2A 2,8284 UI	3A 5,6569 UI	1,0627
	Al(OH) ₃	1B 1,4142 UI	2B 2,2449 UI	3B 5,0396 UI	1,0627
		1C 1,5874 UI	2C 2,8284 UI	3C 5,6569 UI	1,0627
		4A 1,4142 UI	5A 2,8284 UI	6A 5,0397 UI	1,0627
	Ca ₃ (PO ₄) ₂	4B 1,4142 UI	5B 1,7817 UI	6B 4,4898 UI	1,0627
		4C 1,7817 UI	5C 2,2449 UI	6C 4,0000 UI	1,0627
69		7A 7,1272 UI	8A 11,3137 UI	9A 13,3333 UI	1,0627
	Al(OH) ₃	7B 7,1271 UI	8B 11,3137 UI	9B 12,6962 UI	1,0627
		7C 6,3496 UI	8C 11,3137 UI	9C 12,6992 UI	1,0627
		10A 6,3496 UI	11A 8,0000 UI	12A 11,3137 UI	1,0627
	Ca ₃ (PO ₄) ₂	10B 5,6588 UI	11B 7,1272 UI	12B 12,6992 UI	1,0627
		10C	11C	12C	

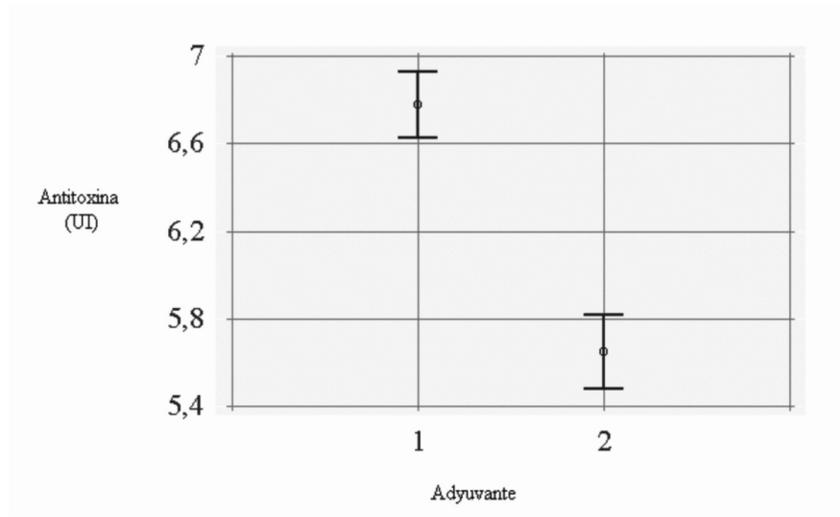
Tabla 2. Prueba de rango múltiple. Variable adyuvante.

MÉTODO: 95,0% LSD			
ADYUVANTE	# ENSAYOS	Promedio Scheffe	Grupos Homogéneos
Hidróxido Al (1)	18	6,77487	X
Fosfato Ca (2)	15	5,65096	X
	CONTRASTE	DIFERENCIA	+/- LIMITES
	1 -2	*1,12391	0,314628

* Diferencia estadísticamente significativa.

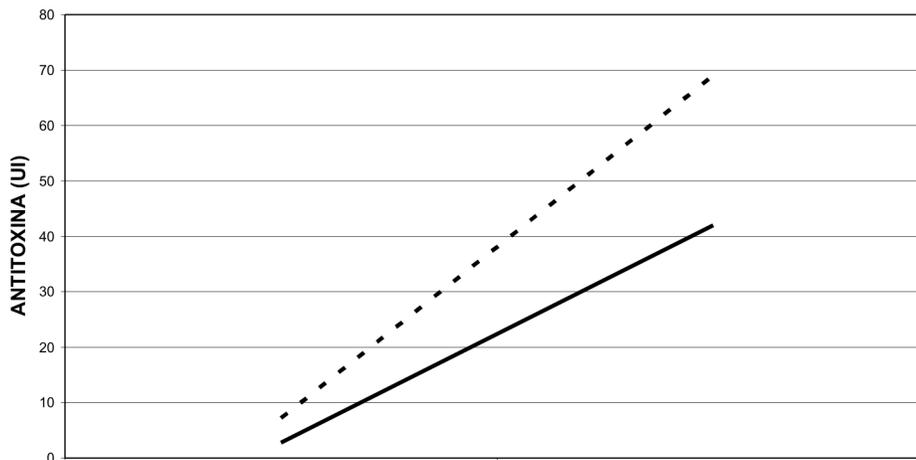
independientemente de los lotes. Claramente se observa la mejor efectividad del hidróxido de aluminio. En cuanto a la interacción entre los dos adyuvantes con respecto a los dos lotes de producción, en la Gráfica 2, se observa que ambos adyuvantes con el lote 69 presentan mejores resultados que con el lote 11.

La comparación entre el comportamiento de la variable adyuvante frente a la respuesta inmunogénica determina que el hidróxido de aluminio es mejor que el fosfato de calcio. Según Aggerbeck *et al.* (1995), el adyuvante hidróxido de aluminio se une fuertemente al antígeno que el fosfato de calcio, esto implica que esa unión tan



Gráfica 1. Comparación estadística entre los adyuvantes con respecto a la respuesta inmunogénica.

INTERACCION ENTRE EL METODO DE PRODUCCION DE LOS LOTES Y EL ADYUVANTE



Gráfica 2. Comparación entre lotes del toxoide tetánico (x) Lote 11, (y) Lote 69 y adyuvante 1 (-----) y adyuvante 2 (____).

fuerte, tenga como resultado una lenta liberación del antígeno y, por ende, una mejor presentación del antígeno al sistema inmune, esto podría explicar la mejor efectividad del adyuvante.

Aggerbeck *et al.* (1996) realizaron un estudio donde comparan estos dos adyuvantes en pruebas de potencia in vivo y determinaron que el hidróxido de aluminio era más efectivo que el fosfato de calcio. Sin embargo, un estudio posterior (Aggerbeck *et al.* 1997) realizado al

nivel clínico con soldados, demostró todo lo contrario, que el fosfato de calcio genera mejores respuestas inmunes pero mayores efectos adversos. En conclusión, según los datos del análisis estadístico entre los dos adyuvantes no hay demasiada diferencia como si se observa con la variable lote. Sin embargo, y según la variabilidad de los resultados no solo de este estudio sino de los anteriormente referenciados demuestra que la reacción biológica a los diferentes adyuvantes varía significativamente.

Los datos arrojados por la variable concentración frente a la respuesta inmunogénica muestran una relación aparentemente lineal entre la concentración formulada y la respuesta inmunogénica, es decir, a mayor concentración de toxoide mayor respuesta inmunogénica. La importancia de estos datos, se encuentra en que se demuestra que independientemente de los lotes o los adyuvantes utilizados sí se puede bajar la concentración de toxoide en la formulación y, a su vez, garantizar que la producción de antitoxina sea de un nivel de 2UI/mL, lo que confirma que se está desperdiciando toxoide en la formulación.

Al comparar la concentración de toxina y el lote frente a la respuesta inmunogénica, se obtienen conclusiones interesantes, como que el lote 11 en las tres concentraciones presenta títulos menores que el lote 69. Esto contradice el rumbo de las investigaciones sobre el mejoramiento de producción y de rendimiento de la toxina antitetánica, pues se ha verificado que el cultivo agitado es superior en rendimiento, en volumen final y en tiempo de producción al cultivo estático, además que reduce la manipulación del producto (Arias *et al.* 2003).

En cuanto a los resultados obtenidos de la variable lote frente a la respuesta inmunogénica, se evidencia que el lote 69 es mejor que el lote 11. En definitiva, la diferencia en el método de producción de los lotes de toxoide tetánico demuestra que éste afecta directamente la respuesta inmunogénica. Al comparar las dos técnicas de producción, el medio de cultivo utilizado, la cepa, la concentración de inóculo, el pH y la temperatura son iguales y lo único que varía es la condición de agitación y el tiempo de producción, lo que llevaría a pensar que el oxígeno afecta directamente la calidad de la toxina y respecto al adyuvante, se concluye que el $\text{Al}(\text{OH})_3$ presenta mejores resultados en cuanto a la efectividad de la vacuna que el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Las vacunas inactivadas requieren agonistas inmunes (inmunopotenciadores o adyuvantes) para determinar el tipo de inmunidad inducida (Th1 o Th2) y promover la respuesta inmunológica. Debido a que los agonistas, además de afectar la inmunidad, también pueden modificar la producción de linfocitos T citotóxicos (CTL), su selección es crítica para la efectividad de las vacunas. Aunque la síntesis de CTL constituye un objetivo para las vacunas, en donde la muerte de las células blanco por parte de los CTL es una meta en sí misma, en otras

vacunas esto se complica en virtud de las exacerbaciones potenciales que pueden promover sobre enfermedades como la hepatitis y la de Alzheimer, en donde la producción de CTL, se debe evitar. El descubrimiento de que los agonistas, al actuar sobre diferentes receptores, puede aumentar sinérgicamente la inmunidad, ha abierto nuevas posibilidades para la síntesis de nuevas vacunas. El hecho de que algunos polisacáridos con modificaciones específicas, potencian la inmunidad Th1, contribuirá al descubrimiento de compuestos sin autoinmunidad asociada. La comprensión de los mecanismos inmunomoduladores de los agonistas también sustentará la utilización de estos agentes como tratamientos independientes (Marciani, 2007)

Las propiedades adyuvantes de las sales de aluminio presentan limitaciones; actualmente se está evaluando una amplia gama de adyuvantes nuevos para su uso en vacunas nuevas o mejoradas. Estas investigaciones están siendo lideradas por el comité consultivo mundial sobre seguridad de vacunas de la OMS (2006). Son ejemplos de estos adyuvantes los estimuladores del sistema inmunitario, los vehículos formados por micropartículas y las emulsiones, así como diversas combinaciones de éstos. Se espera que los adyuvantes permitan el desarrollo de vacunas inocuas y eficaces contra enfermedades para las que aún no hay vacunas, como la malaria y el VIH, así como mejorar la eficacia de otras vacunas. Dado que muchos de los adyuvantes nuevos se utilizarán probablemente en vacunas para enfermedades endémicas en países en desarrollo, será preciso disponer de sistemas para vigilar la seguridad de estas vacunas nuevas (OMS, 2006).

Para analizar la seguridad de los nuevos adyuvantes, una vez combinados en una vacuna, se necesitan estándares mejorados y coherentes que rijan las juntas de seguimiento de la seguridad, la generación de señales y la evaluación posterior para la autorización, la comercialización de las vacunas y la vigilancia de los eventos inmunológicos adversos e inclusive problemas de seguridad inesperados. Los estudios de última fase deben abordar las reacciones adversas que no pueden ser previstas a través de los efectos biológicos de la vacuna y del adyuvante, incluidas las reacciones adversas raras e infrecuentes que no se detectan en los estudios con animales o en los estudios con pocas personas realizados antes de la homologación de la vacuna. Para ello, se necesitan definiciones de caso claras. Todo ello

exige un enfoque clínico, científico y regulador nuevo, que tenga en cuenta la seguridad de los adyuvantes a corto y largo plazo (Vax, 2006).

BIBLIOGRAFÍA

- AGGERBECK, H.; FENGER, C.; HERON, I. 1995. Booster vaccination against Diphtheria and Tetanus in man. Comparison of calcium phosphate and aluminium hydroxide as adjuvants - II. *Vaccine*. 13(14):1366-1374.
- AGGERBECK, H.; WANTZIN, J.; HERON, I. 1996. Booster vaccination against Diphtheria and Tetanus in man. Comparison of three different vaccine formulations - III. *Vaccine*. 14(13):1265-1272.
- AGGERBECK, H.; GIZURARSON, S.; WANTZIN, J.; HERON, I. 1997. Intranasal booster vaccination against diphtheria and tetanus in man. *Vaccine*. 15:307-316.
- ARIAS, J.; CÉSPEDES, M.; DÍAZ, S.; GUTIÉRREZ, I. 2003. Evaluación de la influencia de la agitación y de la concentración de formaldehído en la detoxificación de la toxina tetánica. *Universitas Scient*. 8(2):23-30.
- AZUMA, I. 1992. Synthetic immunoadjuvants: application to nonspecific host stimulation and potentiation of vaccine immunogenicity. *Vaccine*. 10:1000-1006.
- BARRETO, A. R. 2000. Estudio preliminar de la fermentación de *Clostridium tetani*, por cultivo continuo. Tesis de maestría. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia. p.250.
- BENNET, B.; CHECK, I.J.; OLSEN, M.R.; HUNTER, R.L. 1992. A comparison of commercially available adjuvants for use in research. *J. Immunol. Methods* 153:31-40.
- DILIZIO, N.R. 1985. Update on the immunomodulating activities of glucans. *Springer Semin. Immunopathol* 8:387-400.
- GUERRERO, J.; GATTAS, C.R. 1982. Immunomodulating substances: an overview. *Rev Microbiol*. 13(2):110-115.
- GUPTA, R.; RELYVELD, E. 1991. Adverse reactions after injection of adsorbed Diphtheria -Pertussis-Tetanus (DPT) vaccine are not due only to Pertussis organisms or Pertussis components in the vaccine. *Vaccine*. 9:669-702
- INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (INS). 1995. Manual de procedimientos del laboratorio de Tetanos. Bogotá. 120p.
- INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (INS). 1998. Instituto Nacional De Salud. 80 años. Una historia, Un Compromiso. Bogotá (Colombia). 140p.
- LATHAM, W.C.; BENT, D.F.; LEVINE, L. 1962. Tetanus toxin production in the absence of protein. *Appl. Microbiol* 10:142-146.
- MARCIANI DANTE, J. 2007. Avantogen. Ed. SIIC 2a Ed. 22p.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 1997. Vacunas e Inmunización. Situación actual. Ginebra. 25p.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 2006. Vacunas e Inmunización: Situación actual. Ginebra. 10p.
- REYNOLDS, J.A.; KASTELLO, M.D.; HERRINGTON, D.G.; CRABBS, C.L.; PETERS, C.J.; JEMSKI, J.V. 1980. Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious diseases. *Infect. Immun*. 30:51-57.
- ROITT, I.M. 1991. *Essential Immunology*. 7 ed. Oxford: Blackwell Scientific, 326p.
- SPRIGGS, D.; KOFF, W. 1991. *Topics in Vaccine Adjuvant Research*. CRC Press. United States. 145p.
- STEWART-TULL, D.E.S. 1989. Recommendations for the assessment of adjuvants (immunopotentiators). En: Gregoriadis, G.; Allison, A.C.; Poste, G, eds.

- Immunological adjuvants and vaccines. New York: Plenum, p.213-226.
- TAKX-KOHLLEN, B.C. 1992. Immunomodulators. Future prospects. Pharm. Weekbl. Science 14:24-52.
- UNITED STATES HEALTH AND HUMAN SERVICES. 2003. Division of immunization, Atlanta, Georgia. Surveillance for Safety After Immunization: Vaccine Adverse Event Reporting System published on January 24, 2003 Vol. 52, No. SS-1.
- VAX. 2006. Nature´s adjuvant. IAVI Report Bulletin 4(10), Octubre 2006. Disponible desde Internet en: <http://www.iavireport.org/vax/VAXOctober2006.asp> (con acceso 05/03/07).
- WAGNEROVÁ, J.; FERENCÍK, M. 1993. Secretary and regulatory products of macrophages in the immune and inflammatory reactions. Biol. Bratislav. 48(6):709-717.

Recibido: Junio 23 de 2005

Aceptado: Marzo 26 de 2007

DETERMINACIÓN DE MICROALBUMINURIA MEDIANTE LA RELACIÓN ALBÚMINA/CREATININA EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

DETERMINATION OF MICROALBUMINURIA BY MEANS OF THE ALBUMIN/CREATININ RATIO IN DIABETES MELLITUS TYPE-2 PATIENTS

Myriam S. Silva M.¹
Alba L. Salamanca M.²
Martha Guerra de M.³
Milcíades Ibáñez P.⁴
Javier Silva M.⁵
Andrés Alvarado G.⁶

RESUMEN

Para establecer la importancia de la hemoglobina glicosilada (HbA1C), de la glicemia y del tiempo de evolución de la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM tipo 2) en la determinación de la microalbuminuria, como predictora de nefropatía renal incipiente, mediante el empleo de la relación albúmina/creatinina, se estudiaron 30 pacientes

de ambos sexos con DM tipo 2, 15 controlados y 15 no controlados y 30 individuos sanos, con proporción de sexo y edad similares. En ambos grupos, se efectuó glicemia basal, hemoglobina glicosilada en sangre y microalbuminuria en orina puntual en tres momentos diferentes. Los métodos empleados para su valoración fueron: glicemia (Trinder), HbA1C (Craine JE), creatinina (Benedict–Behre) y albúmina (inmunoturbidimetría). Mediante el análisis estadístico, se encontró una correlación directa entre la microalbuminuria, la glicemia, la hemoglobina glicosilada y el tiempo de evolución de la enfermedad, tanto en pacientes controlados como en no controlados, con un mayor nivel de significancia en este último grupo, lo que se puede correlacionar con la literatura referida, a pesar del tamaño de la muestra. En la progresión de la nefropatía diabética, medida en términos de microalbuminuria, hemoglobina glicosilada, glicemia y el tiempo de evolución de la enfermedad, se evidenció que son factores estrechamente relacionados, lo que los hace susceptibles de ser controlados clínicamente en favor del paciente DM tipo 2. Desde el punto de vista experimental y estadístico, la microalbuminuria, el control glicémico y la HbA1C y el tiempo de evolución de la enfermedad son indicadores de nefropatía renal incipiente.

¹ Bact. M.Sc. (A) Genética. Profesor Auxiliar, Unidad de Bioquímica. Instituto de Ciencias Básicas, Fac. Medicina, U. del Rosario msilva@urosario.edu.co

² Bact. Profesor auxiliar. Unidad de Bioquímica. Instituto de Ciencias Básicas, Fac. Medicina, U. del Rosario, asalaman@urosario.edu.co

³ Bact. Docente Investigador, Dir. Especialización Bioquímica Clínica. Instituto de Ciencias Básicas, Pontificia U. Javeriana. mguerra@ujaveriana.edu.co

⁴ Epidemiólogo. Docente Investigador. Instituto de Ciencias Básicas, Fac. Medicina, U. del Rosario, mippalad@yahoo.com

⁵ MD. Residente U.N. mdjsilva@yahoo.com

⁶ MD. Epidemiólogo. M.Sc (A) Genética. Dirección General de Sanidad Militar- Min. Defensa. Colombia, andresferna ndoalvarado@gmail.com

Palabras clave: Diabetes Mellitus tipo 2, membrana basal glomerular, microalbuminuria, tasa de filtración glomerular, nefropatía.

SUMMARY

This research was carried out to establish the importance of glycolated hemoglobin (HbA1C), glycemia and the evolution time of diabetes mellitus (DM) type 2 in the determination of microalbuminuria as prediction factor of incipient renal nephropathy through the use of the albumin/creatinin ratio. Thirty patients of both sexes with controlled and uncontrolled DM type 2, as well as 30 healthy individuals, of similar age and sex proportion, were tested. Both groups were submitted during three weeks at three different moments to blood tests of basal glycemia and glycolated hemoglobin and microalbuminuria in punctual urine. The methods used for the evaluation were glycemia (Trinder), HbA1C (Craine JE), creatinin (Benedict-Behre) and albumin (immunoturbidimetria). Statistical analysis revealed a direct correlation between microalbuminuria, glycemia, glycolated hemoglobin and disease evolution time in both controlled and uncontrolled patients, with a mayor level of significance in the latter group. Within the progress of diabetes nephropathy, measured in terms of microalbuminuria, glycemia, glycolated hemoglobin and disease evolution time, their close relationship was made evident, which makes these factors susceptible to be clinically controlled in favor of DM type 2 patients. From the experimental and statistical point of view microalbuminuria, glyceamic control and the disease evolution time are indicators of incipient renal nephropathy.

Key words: Diabetes Mellitus type 2, basal glomerular membrane (BMG), microalbuminuria, glomerular filtration rate, nephropathy.

INTRODUCCIÓN

La microalbuminuria fue descrita por Harry Keen en Londres, en los años 60, quien hizo referencia a la excreción elevada de albúmina por debajo del rango de proteinuria, que podría tener significación en la historia natural de la nefropatía diabética temprana. Recientemente se ha documentado que la microalbuminuria es un elemento predictivo de la evolución de la nefropatía diabética, lo que confirma la importancia de su control mediante el

tratamiento intensivo de la diabetes (Ruggenti *et al.* 2004; Pijls *et al.* 2002).

Por otra parte, también ha sido demostrada la importancia de la variación de la microalbuminuria dentro del marco de la valoración de la eficacia del tratamiento antihipertensivo, así como en el retardo de la evolución de la enfermedad renal asociada a la diabetes (Wasen *et al.* 2004; Masoud *et al.* 2004). La hipertensión de los DM tipo 2, se puede descubrir antes o en el momento del diagnóstico o bien aparece después en relación con la nefropatía diabética (Wirta *et al.* 1999; Moran, 2004; Cederholm *et al.* 2005). La hipertensión ejerce un efecto nocivo sobre la velocidad de la aparición y la progresión de las complicaciones propias de la diabetes, como la nefropatía y la retinopatía (Moran *et al.* 2004; Muñoz *et al.* 1997; Krolewski *et al.* 1995). De igual manera, la hemoglobina glicosilada (HbA1C) permite acercarse a los valores promedios de glucosa sanguínea que el paciente ha mantenido a lo largo de la vida del eritrocito. Además de reflejar el control metabólico del paciente, la HbA1C posee la ventaja de que sus niveles no varían agudamente con la ingestión de alimentos, ni puede ser modificada de manera voluntaria por el paciente. Por lo tanto, la medición de la HbA1C da una información útil para el manejo del diabético, ya que su elevación refleja control metabólico deficiente de la glucosa sanguínea, que finalizará con una elevación de la microalbuminuria (Cederholm *et al.* 2005). La nefropatía diabética, se desarrolla en etapas caracterizadas por hiperfiltración, seguida de microalbuminuria y, eventualmente uremia. La duración media entre el diagnóstico de microalbuminuria y la nefropatía diabética tipo 2 ha sido reportado entre 7 y 9 años. La detección precoz de la nefropatía da la oportunidad de intervenir terapéuticamente para prevenir la falla renal y la morbilidad cardiovascular (Tam *et al.* 2004; Yoo *et al.* 2004). Desde el momento en que la protenuria clínicamente se manifiesta, se sabe que el estricto control glicémico durante más de dos años no produce cambios en el promedio de disminución de la filtración glomerular, de ahí la importancia del estricto control glicémico y la detección precoz de la complicación renal en sus estadios iniciales mediante la microalbuminuria (Segura *et al.* 2004; Weir, 2004; Wittmann *et al.* 2005).

En la evaluación de la microalbuminuria, se han utilizado diversas unidades de medida, lo que ha creado confusión en este campo. Según la convención Gento-

fle-Montecatini, cuando la tasa de excreción urinaria de albúmina (TEUA) en orina de 24 horas o en una orina recogida durante el día se encuentra dentro del rango de 30 – 300mg/24 h (20-200µg/min), se puede confirmar la existencia de microalbuminuria (Ruggenenti *et al.* 2004; Masoud *et al.* 2004; Moran *et al.* 2004; Muñoz *et al.* 1997).

De acuerdo con la literatura disponible, la microalbuminuria es una complicación frecuente en la población diabética, por cuanto está presente hasta en un 40% de los pacientes, bien sean diabéticos tipo 1 o diabéticos tipo 2, especialmente en aquellos con antecedentes de hipertensión, mal control glicémico y neuropatía (Masoud *et al.* 2004; Tam *et al.* 2004). Pero además, la microalbuminuria no es tan sólo una complicación microangiopática frecuente, sino también un marcador de tanto de enfermedad renal terminal como de enfermedad cardiovascular (Wasen *et al.* 2004; Wirta *et al.* 1999; Moran *et al.* 2004; Liu *et al.* 2002; Tam *et al.* 2004; Erdmann, 2006).

En el presente estudio fueron analizados 30 pacientes diabéticos tipo 2, con el fin de determinar microalbuminuria y la posible presencia de nefropatía renal incipiente en una población colombiana. Si se tiene en cuenta que hasta la fecha no se conocen publicaciones sobre el tema en nuestro país es pertinente el intento de identificar una entidad, como la nefropatía incipiente, dentro el grupo objeto de estudio, con base en la utilización de un método sencillo y práctico, como lo es la determinación de la microalbuminuria, mediante la relación albúmina/creatinina (Weir, 2004; Lane, 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio observacional o serie de casos analítico, se llevó a cabo en pacientes diabéticos tipo 2 (n=30), controlados y no controlados, con edades comprendidas entre 40 y 60 años, seleccionados en el servicio de consulta externa del Dispensario Ayacucho de la Policía Nacional de Bogotá, quienes mediante firma de consentimiento informado hicieron posible el presente estudio.

En forma simultánea, se estudió un grupo de individuos sanos, en igual proporción de sexo y de edad, sin patologías asociadas a las alteraciones descritas en el

grupo anterior, seleccionados también en la Clínica de la Policía Nacional.

La selección del grupo de pacientes con DM tipo 2, se hizo mediante valoración de su historia clínica, utilizando una encuesta donde se valoró, entre otras, tensión arterial y edad. Los pacientes considerados como controlados exhiben valores promedio de glicemia menor o igual a 130 mg/dL, HA1C menor o igual a 7,5% y una tensión arterial menor o igual a 130/80mmHg. Como condiciones preanalíticas, se indicó a los sujetos experimentales un ayuno no menor a 12 horas, así como evitar en lo posible el estrés y el ejercicio fuerte y bebidas alcohólicas.

Las muestras de sangre en ayunas para determinar glicemia y HA1C, se obtuvieron mediante venopunción. También fueron analizadas muestras de orina puntual, en el orden de tres muestras en el transcurso de tres meses (una por mes).

Los parámetros bioquímicos y los métodos utilizados en el presente estudio fueron: glicemia por el método de Trinder, hemoglobina glicosilada por el método de Craine J.E, creatinina por Benedict-Behre (Muñoz *et al.* 1997) y albúmina, por inmunoturbidimetría (Muñoz *et al.* 1997).

Los resultados obtenidos fueron analizados en términos de valores individuales, promedios y desviaciones estándar de glicemia, HbA1C y microalbuminuria.

La normalidad de los grupos fue evaluada con la prueba Kolmogorov-Smirnov, mientras que para medir la homogeneidad de las varianzas, se utilizó la prueba de Levene. En casos de heterogeneidad, se aplicó la prueba t-student. Para varianzas heterogéneas y sin cumplimiento de normalidad, se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney asintótica. Idénticas pruebas estadísticas fueron aplicadas para la valoración de los resultados obtenidos, tanto en los grupos controlado y no controlado de los pacientes con DM tipo 2 como en el grupo control.

En el análisis estadístico de los resultados fueron aplicadas las pruebas t Student y el análisis de correlación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de comparar la microalbuminuria en diferentes momentos, los resultados obtenidos fueron agrupados en cuatro categorías, de acuerdo a control o no control y a tiempo de evolución de la enfermedad:

- 1.- Controlado con 2 a 4 años de evolución; n= 10
- 2.- No controlado con 2 a 4 años de evolución; n= 9
- 3.- Controlado con 5 a 7 años de evolución; n= 5
- 4.- No controlado con 5 a 7 años de evolución; n= 6

En estos grupos fueron evaluados previamente los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Teniendo en cuenta la robustez para normalidad, se utilizó un análisis de covarianza, mediante un ajuste por edad para los valores de microalbuminuria, en los cinco grupos de estudio.

En otro modelo de análisis de covarianza por edad, se efectuó ajuste de glicemia, de hemoglobina y de tensión arterial. El nivel de significancia utilizado en la evaluación de las pruebas estadísticas fue de 5% ($p < 0,05$)

En el grupo de pacientes con DM tipo 2, el promedio de edad en años fue $51,2 \pm 5,0$ mayor en forma significativa que el promedio en años en el grupo control donde fue de $47,8 \pm 6,0$ ($p = 0,024$, t-Student). En cuanto a los promedios por género, en hombres fue 53,3% y en mujeres 46,7%.

Los valores de microalbuminuria medidos en el primer momento, tanto para el grupo de pacientes con y sin DM tipo 2, mostraron distribuciones diferentes a normal ($p < 0,05$). Al efectuar la comparación, se encontró en los pacientes diabéticos una mediana significativamente mayor a la de los pacientes sanos (11 vs 6) ($p < 0,001$) (Tabla 1).

Tabla 1. Medidas descriptivas de glicemia y hemoglobina, entre los grupos de estudio.

		No.	Promedio	Desviación estándar	Error estándar	Intervalo de confianza del 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Glicemia	Control (sin diabetes)	30	86,30	4,81	0,88	84,50	88,10	78	94
	Controlado 2-4	10	121,80	19,92	6,30	107,55	136,05	92	154
	No controlado 2-4	9	197,33	48,80	16,27	159,83	234,84	138	268
	Controlado 5-7	5	125,80	24,94	11,16	94,83	156,77	102	168
	No controlado 5-7	6	169,17	49,28	20,12	117,45	220,88	119	231
	Total	60	120,45	48,80	6,30	107,84	133,06	78	268
Hemoglobina glicada	Control (sin diabetes)	30	4,513	,181	3,313E-02	4,446	4,581	4,2	4,8
	Controlado 2-4	10	6,400	,625	0,198	5,953	6,847	5,3	7,5
	No controlado 2-4	9	9,244	1,207	0,402	8,316	10,173	7,8	11,2
	Controlado 5-7	5	6,160	,826	0,370	5,134	7,186	5,4	7,4
	No controlado 5-7	6	9,750	1,540	0,629	8,134	11,366	7,7	12,0
	Total	60	6,198	2,161	0,279	5,640	6,757	4,2	12,0

En la evaluación de la microalbuminuria en los pacientes diabéticos en los tres momentos la mediana del segundo aumentó con relación al primer y al tercer momento, con medianas iguales, aunque estas diferencias no fueron significativas ($p=0,559$). En el grupo con DM tipo 2, la mediana de la hemoglobina fue significativamente mayor que en el grupo de pacientes sanos ($p<0,001$).

Entre los dos subgrupos, uno controlado ($n=15$) y el otro no controlado ($n=15$) del grupo con DM tipo 2 no se encontraron diferencias por edad ($p=0,09$), tensión arterial diastólica ($p=0,285$), sistólica ($p=0,486$). Se

encontraron diferencias significativas siendo mayor el promedio en el grupo no controlado que en el controlado, en glicemia ($186,07\pm 49,31$ vs. $123,13\pm 20,90$, $p<0,001$) y en hemoglobina ($9,45\pm 1,32$ vs. $6,32\pm 0,68$; $p<0,001$). En la evaluación de las microalbuminurias (A/C) fueron mayores las medianas en los pacientes diabéticos no controlados que en los no controlados, siendo significativas estas diferencias en el tercer momento ($p=0,03$) y muy cerca de mostrar diferencias en el primer ($p=0,0685$) y segundo momento ($p=0,063$) (Tabla 2).

Tabla 2. Medidas descriptivas de microalbuminuria en tres momentos, entre los grupos de estudio.

		No.	Promedio	Desviación estándar	Error estándar	Intervalo de confianza del 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
A/C1	Control (sin diabetes)	30	5,83	1,97	0,36	5,10	6,57	3	10
	Controlado 2-4	10	9,20	7,97	2,52	3,50	14,90	3	30
	No controlado 2-4	9	12,11	7,03	2,34	6,71	17,51	5	26
	Controlado 5-7	5	22,60	16,04	7,17	2,68	42,52	4	43

El tiempo de evolución de los pacientes diabéticos varió entre 2 y 7 años, con un promedio de $4,1\pm 1,6$ años (mediana de 4 años) y no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes controlados y no controlados ($p=0,713$). En la comparación de los valores de microalbuminurias (A/C) entre los pacientes con DM tipo 2 fueron mayores las medianas en los pacientes con mayor tiempo de evolución de 5 a 7 años que en los pacientes entre 2 a 4 años, siendo significativas estas diferencias en el primer momento ($p=0,005$) y muy cerca de mostrar diferencias en el segundo momento ($p=0,056$) y tercer momento ($p=0,10$).

Teniendo en cuenta en los pacientes diabéticos si están siendo controlados y el tiempo de evolución, se conformaron cuatro grupos (1. Controlado, de 2 a 4 años; 2. No controlado, de 2 a 4 años; 3. Controlado,

de 5 a 7 años y 4. No controlado, de 5 a 7 años), para comparar los valores de microalbuminurias medidas en tres momentos, siendo significativas las diferencias en el primer momento (A/C1) ($p=0,014$), y cerca de mostrar diferencias en el segundo momento (A/C2) ($p=0,093$) y en el tercer momento ($p=0,0545$). En el primer momento, la microalbuminuria (A/C1) la mediana mayor fue en el grupo no controlado entre 5 y 7 años de evolución mostrando diferencias significativas con el grupo controlado y con 2 a 4 años de evolución y con el no controlado y con 2 a 4 años de evaluación; en los otros momentos se presentaron las mismas tendencia (Figuras 1, 2, 3).

Se conformaron cinco grupos de comparación teniendo en cuenta el grupo de pacientes control o sin diabetes y se evaluó la microalbuminuria en el primer momento,

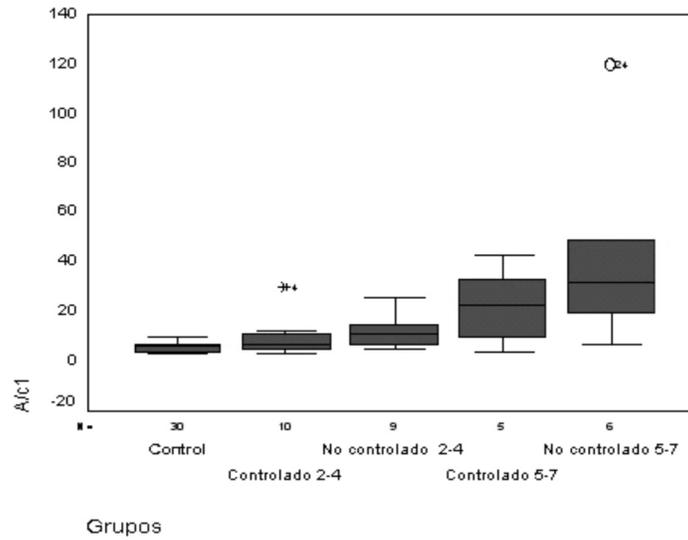


Figura 1. Distribución de microalbuminuria en el primer momento (A/C1), entre los grupos de estudio.

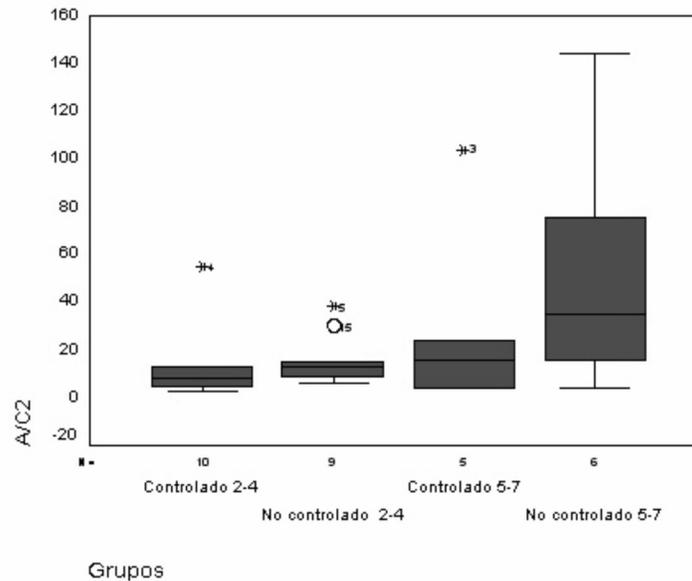


Figura 2. Distribución de microalbuminuria en el segundo momento (A/C2), entre los grupos de estudio.

donde se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($p=0,014$), la mediana fue mayor en el grupo no controlado y con 5 a 7 años de evolución significativamente con el grupo control, controlado y con 2 a 4 años y no controlado con 2 a 4 años (Figura 1).

En un modelo de análisis de covarianza ajustando por las diferencias por la edad de los pacientes, se encontraron

diferencias significativas, similar a las encontradas sin ajuste entre los grupos, en los valores de microalbuminuria en el primer momento (A/C1). También en un modelo ajustado por edad, tensión arterial sistólica, diastólica, glicemia y hemoglobina, las diferencias fueron significativas y, específicamente, en el grupo no controlado con 5 a 7 años de evolución que en los no controlados con 2 a 4 años de evolución (Figuras 1, 2, 3).

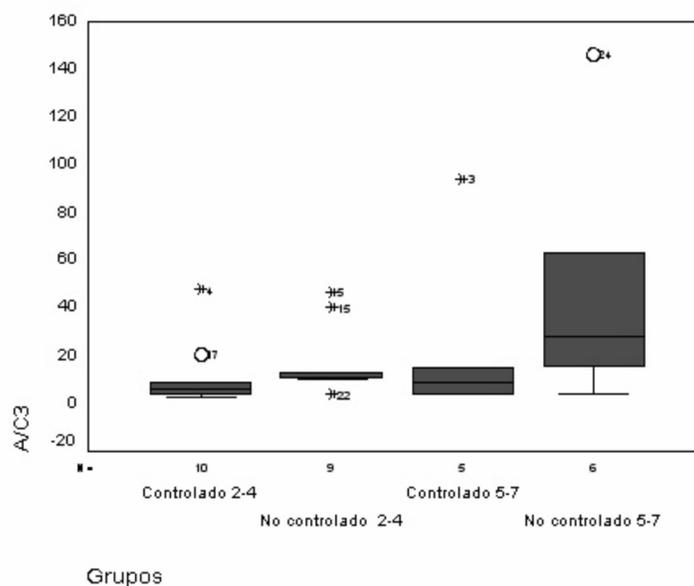


Figura 3. Distribución de microalbuminuria en el tercer momento (A/C3), entre los grupos de estudio.

El desarrollo de métodos sensibles y específicos por radioinmunoensayo para determinar la presencia de microalbúmina en orina permitió realizar el presente estudio, ya que las pruebas para proteinuria, como primer indicador de nefropatía diabética son muy insensibles, porque resultan positivos solo cuando la excreción de proteína en la orina es 3 o 4 veces la normal.

El objetivo fue detectar estadios subclínicos de excreción aumentada de proteínas, como indicativo de cambios iniciales en el riñón del diabético, se conoce que la albúmina es el principal componente del total de proteínas urinarias en la nefropatía diabética. Además, una de las principales causas de morbilidad en pacientes que presentan DM tipo 2, lo que obliga al personal médico a prevenir y buscar signos tempranos que demuestren la instauración de este tipo de daño, como la microalbuminuria y en un momento determinado, se puede apreciar una relación directa entre la presencia de microalbuminuria e hipertensión. Por otra parte, a la hora de la evolución del análisis del cuadro clínico, es recomendable evaluar el tipo de medicamentos que utiliza el paciente, ya que algunas de las sustancias farmacéuticas utilizadas en el manejo de la hipertensión arterial y de algunas arritmias, como los inhibidores de las enzimas convertidas de angiotensinas y betabloqueadores, pueden modificar la presentación del cuadro de microalbumi-

nuria en aquellos pacientes que las utilizan por razones no relacionadas de manera directa con la DM tipo 2, a pesar de llevar tiempo presentando nefropatía.

La medición de la HbA1C ha sido indicador del comportamiento de la diabetes, llegando a constituir más del 12% de la hemoglobina circulante en pacientes que presentan descompensación en sus niveles de glicemia. La vida media del eritrocito es de 120 días, pudiéndose extrapolar el comportamiento de los niveles de glucosa por un periodo hasta de cuatro meses, dando una perspectiva aproximada del manejo que ha tenido el paciente, respecto a su dieta y su medicación.

CONCLUSIONES

Se observa la presencia de microalbuminuria en aquellos pacientes que presentaron DM tipo 2, lo cual se puede relacionar, de acuerdo a lo explorado en la bibliografía, con el riesgo de desarrollar nefropatía clínicamente manifiesta.

La relación de albúmina/creatinina permite el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de los pacientes diabéticos tipo 2, abriendo la posibilidad de reversión de la progresión de la enfermedad renal terminal.

Desde el punto de vista estadístico y experimental, el control glicémico, HbA1C y la microalbuminuria, permiten detectar nefropatía diabética temprana.

La presencia de microalbuminuria traduce una lesión de la MBG, esto es la presencia de enfermedad microangiopática, que sin duda en la DM tipo 2 esta estrechamente relacionada con el control glicémico y el tiempo de evolución de la enfermedad, lo que obliga a ahondar en trabajos posteriores sobre el comportamiento nutricional del paciente en la presentación de microalbuminuria, recordando la relación existente entre dichos hábitos y el grado de daño tisular generado en el transcurso del tiempo sobre el riñón.

A pesar de no encontrarse una diferencia estadísticamente significativa en los valores de edad dentro de la muestra, se debe recordar que la evaluación de la glicemia y la hemoglobina glicada entre pacientes controlados y no controlados relacionado con el control de microalbuminuria en diferentes momentos permite establecer que un pobre control glicémico y el desarrollo de microalbuminuria pueden ser tomados como factores susceptibles que juegan un importante papel en la progresión a enfermedad renal diabética.

El tiempo de evolución de la DM tipo 2 y los valores de microalbuminuria permiten relacionar estas dos con el favorecimiento a nefropatía diabética.

La determinación de microalbuminuria mediante la relación albúmina/creatinina es un método práctico, sencillo y sensible que se recomienda en la práctica clínica para el manejo y el control del paciente diabético.

AGRADECIMIENTOS

A aquellas personas que padecen de diabetes; este es nuestro aporte en procura de su bienestar.

BIBLIOGRAFÍA

- CEDERHOLM, J.; ELIASSON, B.; NILSSON, P.M.; WEISS, L.; GUDBJORNSDOTTIR. 2005. For the steering committee of the Swedish National Diabetes Register. *Diabetes Res Clin Pract.* 67:258-266.
- ERDMANN, E. 2006. Microalbuminuria as a marker of cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes. *Internal J. Cardiology.* 107:147-153.
- KROLEWSKI, A.S.; LAFFEL, L.M.; KROLEWSKI, M.; QUINN, M.; WARAM, J.H. 1995. Glycosylated hemoglobin and the risk of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 332(19):1251-1255.
- LANE, J.T. 2004. Microalbuminuria as a marker of cardiovascular and renal risk type 2 diabetes mellitus: a temporal perspective. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 55(6):442-450.
- LIU, D.P.; MOLYNEAUX, L.; CHUA, E.; WANG, Y.Z.; WU, C.R.; JING, H.; HU, L.N.; LIU, Y.J.; XU, ZR.; YUE, D.K. 2002. Retinopathy in a Chinese population with type 2 diabetes: factors affecting the presence of this complication at diagnosis of diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 56:125-131.
- MASOUD, R.; MOHAMMAD, A.; MOHAMMAD, R. 2004. Retinopathy and microalbuminuria in type 2 diabetic patients. *BMC Ophthalmol* 4: 9-13.
- MORAN, A.; PALMAS, W.; FIELD, L.; BHATTARAI, J.; SCHWARTZ, J.E.; WEINSTOCK, R.S.; SHEA, S. 2004. Cardiovascular autonomic neuropathy is associated with microalbuminuria in older patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 27(4):972-977.
- MUÑOZ, G.D.; ACHIARDI, R.; DELGADO, J. 1997. Nefropatía Diabética. *Universitas Médica.* 38 (4):140-146.
- PIJLS, L.T.J.; DE VRIES, H.; TH, M.J.; DONKER, A.J.M. 2002. Protein restriction, glomerular filtration rate and albuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized trial. *Eur. J. Clin.* 56(12):1200-1207.
- RUGGENENTI, P.; FASSI, A.; ILIEVA, A.P.; BRUNO, S.; ILIEV, I.P.; BRUSEGAN, V.; RUBIS, N.; GHERARDI, G.; ARNOLDI, F.; GANEVA, M.; ENE-IORDACHE, B.; GASPARI, F.; PERNA, A.; BOSSI, A.; TREVISAN, R.; DODESINI, A.R.; REMUZZI, G.. 2004.

- Preventing microalbuminuria in Type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 351(19):1941-1951.
- SEGURA, J.; CAMPO, C.; RUILOPE, L.M. 2004. Effect of proteinuria and glomerular filtration rate on cardiovascular risk in essential hypertension. *Key Int.* 11(92):45-49
- TAM, T.K.; CHENG, L.P.; LAI, D.M.; LAI, T.C.; LAI, W.Y.; NG, K.K. NG, M.Y.; KONG, C.W.; TSANG, L.C. 2004. The prevalence of microalbuminuria among patients with type I diabetes mellitus in primary care setting: cross –sectional study. *Hong Kong Med. J.* 10(5):307-311.
- WASEN, E.; ISOAHO, R.; MATTILA, K.; VAHLBERG, T.; KIVELA, S.L.; IRJALA, K. 2004. Renal impairment associated with diabetes in the elderly. *Diabetes Care.* 27(11):2648-2653.
- WEIR, M.R. 2004. Albuminuria predicting outcome in diabetes. *Incidence of microalbuminuria in Asia-Pacific Rim. Kidney.* 92:45-49.
- WIRTA, O.; PASTERNAK, A.; MUSTONEN, J.; LAI-PPALA, P.; LAHDE, Y. 1999. Retinopathy is independently related to microalbuminuria in type 2 diabetes Mellitus. *Clin. Nephrol.* 51:329-334.
- WITTMANN, I.; MOLNÁR, G.; DEGRELL, P.; WAGNER, Z.; TAMASKÓ, M.; LACZY, B.; BRANSNYÓ, P.; WAGNER, L.; NAGY, J. 2005. Prevention and treatment of diabetic nephropathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* S68:36-42.
- YOO, E.G.M.; CHOI, I.K.; KIM, D.H. 2004. Prevalence of microalbuminuria in young patients whit type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J. Pediatr. Endocrin. Metab.* 17(10):1423-1427.

Recibido: Mayo 11 de 2006

Aceptado: Mayo 3 de 2007

INFLUENCIA DEL ALUMINIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ EN COLIFLOR

(*Brassica oleracea* L., var. Botrytis, Hib. 'Nevada F1')

INFLUENCE OF ALUMINUM ON ROOT GROWTH IN CAULIFLOWER

(*Brassica oleracea* L., var. Botrytis, Hib. 'Nevada F1')

Fánor Casierra-Posada¹

Julián F. Cárdenas-Hernández²

RESUMEN

Entre 40 y 50% de la superficie cultivable en el mundo corresponde a suelos ácidos con problemas de toxicidad por aluminio, lo cual es uno de los factores que más limitan la producción vegetal en suelos ácidos. Hortalizas, como el coliflor, se desarrollan en Colombia, con frecuencia en suelos ácidos. En Tunja, Colombia, se realizó un ensayo de invernadero para determinar el efecto de la relación $(Ca+Mg+K)/Al$ sobre el desarrollo de la raíz. El objetivo principal de este trabajo fue el estudio del crecimiento de las raíces y de la acidez titulable medida en la solución nutritiva donde crecían plántulas de coliflor (*Brassica oleracea* L., var. Botrytis) expuestas a altas concentraciones de aluminio. Las plántulas, se desarrollaron en vasos plásticos con capacidad para 150 ml de solución nutritiva. Los tratamientos se basaron en una relación $(Ca+Mg+K)/Al$ equivalente a 1, 0,7 y 0,5 en la solución nutritiva. A la solución de las plantas

control no se adicionó aluminio. Luego de 34 días del transplante, se determinó la longitud total de la raíz, el pH y la acidez titulable de la solución nutritiva. La longitud radical, se redujo considerablemente con el aluminio. El pH y la acidez titulable, de igual manera, dependieron de la concentración del metal. Mientras que la acidez titulable se incrementó con el contenido de aluminio, el pH de la solución se redujo. Los resultados muestran que las raíces de las plantas de coliflor son muy sensibles a la toxicidad por aluminio.

Palabras clave: Toxicidad, estrés por Al, relación $Ca+Mg+K/Al$.

SUMMARY

Approximately 40–50% of the world's potentially arable soils are acidic and aluminum (Al) toxicity has been recognized as one of the most important limiting factors of plant productivity on acidic soils. Vegetables, as cauliflower (*Brassica oleracea* L., var. Botrytis) are grown in Colombia frequently on acidic soils. A greenhouse experiment was conducted at Tunja, Colombia to determine the relationship between the $(Ca+Mg+K)/Al$ ratio and root development. The main goal of this work was to study the root growth and the titrable acidity measured in the nutrient solution, where cauliflower seedlings grow, exposed to high aluminum concentrations. Plantlets were

¹ Ingeniero Agrónomo PhD., Docente Asociado, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Apartado aéreo 661, Tunja – Boyacá / Colombia. Grupo de Investigación Ecofisiología Vegetal. E-mail: fcasierra@tunja.uptc.edu.co

² Estudiante de Ingeniería Agronómica, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja – Boyacá. E-mail: julianc0182@yahoo.es

grown in 150 mL plastic containers with nutrient solution. Treatments were (Ca+Mg+K)/Al ratio equivalent to 1, 0.7, and 0.5 in the nutrient solution. To the growth solution of the control plantlets was Al was added. After 34 days of transplanting, total root length, pH and titrable acidity of the nutrient solution were measured. The root length was strongly reduced by Al. pH and the titrable acidity measured in the nutrient solution depended on Al concentration. While the titrable acidity increased as Al concentration was higher, pH of the nutrient solution decreased. Results showed that roots of cauliflower plantlets are sensitive to Al toxicity.

Key words: Toxicity, Al stress, relationship Ca+Mg+K/Al.

INTRODUCCIÓN

El aluminio es el elemento metálico más abundante en la corteza terrestre y constituye cerca de 8% de su peso. Este elemento es demasiado reactivo para ser encontrado en forma libre, además, en condiciones ligeramente ácidas o neutras ($\text{pH} > 6$), se encuentra unido a los silicatos y a los óxidos minerales y, por tanto, no representa mayores riesgos de toxicidad para los seres vivos; sin embargo, en condiciones fuertemente ácidas, el aluminio se libera a partir de formas insolubles, con lo cual se incrementa su disponibilidad en el suelo y las posibilidades de causar toxicidad a los seres vivos. La química particular, dependiente del pH que presenta el aluminio, puede ser una de las razones por las cuales, a pesar de su abundancia en los sustratos, este elemento no parece ser utilizado con algún propósito biológico conocido y, generalmente, se le reconoce como un elemento no esencial para los seres vivos (Johnson & Bennet, 1991; Bulanova *et al.* 2004).

El aluminio tiene la capacidad de alterar el metabolismo celular dependiente del Ca^{2+} , dado que permite la acumulación de niveles de Ca^{2+} en el citoplasma por encima de los valores normales o impide que se mantenga el Ca^{2+} en formas transitorias en el citoplasma y, de esta manera, se alteran algunos procesos metabólicos de vital importancia para el vegetal, como la división y la elongación celular (Rengel, 1992). Matsumoto & Morimura (1980) y Horst *et al.* (1983) reportaron la inhibición de la multiplicación celular mediante la interacción del aluminio con la cromatina. Por su parte, Horst & Klotz (1990) encontraron que el aluminio afecta, en primera

medida, la elongación celular en lugar de la mitosis en raíces de *Glycine max*.

Los mecanismos responsables de la reducción de la multiplicación celular en raíces de plantas que han sido expuestas a aluminio son aún tema de investigación. Se ha propuesto que este efecto puede estar relacionado con ciertas alteraciones que el aluminio causa al ADN o a otro tipo de material genético. Parece ser que la acumulación del aluminio en el interior de las células de los ápices de las raíces empieza a los 30 minutos de exposición al metal (Delhaize *et al.* 1993; Vázquez *et al.* 1999) y además, se ha demostrado que este elemento se une al núcleo y al ADN de las células (Matsumoto, 1991).

Una cantidad relativamente grande del carbono asimilado mediante el proceso de fotosíntesis, se exuda a través de las raíces de los vegetales. Este carbono está representado en una fracción significativa de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, como el oxálico, tartárico, succínico, málico, cítrico y algunos aminoácidos (Marschner, 1995). La concentración de ácidos orgánicos en la solución de suelo es generalmente baja (1×10^{-3} - $4 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$); sin embargo, se han encontrado grandes cantidades de ácidos orgánicos en la rizósfera de plantas cultivadas. El área de contacto de las raíces con el suelo es una zona de una gran actividad biológica, donde se desarrollan muchos tipos de microorganismos, los cuales son más activos en ese sitio que en el resto del volumen de suelo, y sintetizan muchos ácidos orgánicos alifáticos y fenoles (Vance *et al.* 1996). La secreción de ácidos orgánicos en plantas expuestas a Al^{3+} , se considera un mecanismo de vital importancia para desarrollar tolerancia a este metal (Ma, 2000). Los canales transportadores de aniones, un tipo de proteína presente en la membrana, regula la secreción de ácidos mediante la activación de los canales por interacción directa del aluminio ya sea con el canal proteico o con un receptor específico en la membrana (Delhaize & Ryan, 1995; Ma *et al.* 2001; Piñeros & Kochian, 2001).

Los exudados de las raíces comprenden sustancias de alto y bajo peso molecular. Las sustancias más importantes de alto peso molecular son el mucílago, los polisacáridos y las ectoenzimas, mientras que los principales constituyentes de los exudados radicales de bajo peso molecular son los carbohidratos, los ácidos orgánicos, los aminoácidos, los péptidos y los fenoles. Mientras

la toxicidad por aluminio induce la exudación de ácido cítrico en raíces, la deficiencia de fósforo promueve la secreción de ácido oxálico, pero en ambos casos puede suceder la exudación de ácido málico en *Glycine max* (Liao *et al.* 2006). La naturaleza de los ácidos orgánicos presentes en la rizósfera difiere con el tipo de planta expuesta a aluminio; en *Phleum pratense* normalmente se encuentra ácido oxálico, fórmico acético y láctico, pero no se ha detectado ácido málico ni cítrico, muy comunes de encontrar en la rizósfera de otras plantas (Heim *et al.* 2001). Los ácidos tartárico y oxálico están representados ampliamente en la rizósfera de los suelos y se pueden originar a partir de los procesos de lisis de las células microbiales o provienen de los exudados de las raíces en cereales, leguminosas y solanáceas (Fox & Comerford, 1990; Ma, 2000; Casierra-Posada, 2001, 2002; Yang *et al.* 2006). El ácido cítrico exudado por la planta o producido por bacterias en la rizósfera e identificado en los exudados radicales es uno de los ácidos orgánicos más abundantes en la rizósfera (Huang & Violante, 1986; Violante & Gianfreda, 1995; Vance *et al.* 1996). Tanto el citrato como el malato tienen un papel muy importante en la tolerancia al aluminio, por tanto, la activación de genes que decodifican el transporte de estos ácidos es vital en la exudación inducida por aluminio (Hoekenga *et al.* 2006; Yang *et al.* 2006).

La interacción entre los compuestos bioquímicos y los minerales del suelo, que tiene lugar en la rizosfera, induce la precipitación de los óxidos de hierro y aluminio (Huang & Violante, 1986; Vance *et al.* 1996). Todos los ácidos orgánicos de bajo peso molecular tienen la posibilidad de interactuar con los productos hidrolíticos de hierro y de aluminio formando precipitados organominerales. La cantidad de precipitados no cristalinos de hierro y de aluminio extraídos es más abundante en la rizosfera que en otras zonas del suelo fuera de ella; además, la cantidad de hierro y de aluminio extraída tiene una correlación positiva con el contenido de carbono, lo que sugiere una asociación química entre esos compuestos orgánicos e inorgánicos (Sarkar *et al.* 1979). Los precipitados orgánicos de Al^{3+} en el suelo tienen la capacidad de fijar grandes cantidades de fosfatos (Bloom, 1981; Haynes & Swift, 1989). Además, la naturaleza y la cantidad de compuestos orgánicos coprecipitados en óxidos de Al^{3+} , así como el área superficial y la cristalinidad de los minerales, juegan un papel muy importante en la adsorción de fosfatos (Violante & Huang, 1989). Los

coprecipitados aluminio-orgánicos (como los complejos formados entre aluminio y ácido oxálico), los cuales se pueden formar en la rizósfera y en los suelos ácidos pueden tener una gran influencia sobre la adsorción de fosfatos en ausencia o en presencia de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (De Cristofaro *et al.* 2000).

El objetivo de este trabajo fue la determinación del efecto de la concentración de aluminio, sobre el crecimiento de las raíces y sobre la acidez titulable en la solución nutritiva de plantas de coliflor (*Brassica oleracea*) cultivadas en solución aireada, bajo condiciones de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo tuvo lugar en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia en Tunja - Colombia, ubicada a 2690msnm. Como material vegetal, se utilizaron plántulas de coliflor del híbrido 'Nevada F1', distribuido en Colombia por la empresa Impulsemillas. Las semillas germinaron en arena previamente lavada con HCl 1N y enjuagada con abundante agua destilada. Cuando las plántulas desarrollaron entre dos y tres hojas, se trasladaron a vasos plásticos con capacidad para 150mL. En cada contenedor se colaron 100mL de una solución nutritiva, con la siguiente composición (los valores mencionados se adicionaron en $g \cdot L^{-1}$): N: 0.4, P_2O_5 : 0,03, K_2O : 0,05, CaO: 0,0005, MgO: 0,0013, S: 0,00137, B: 0,0002, Cu: 0,00014, Fe: 0,00012, Mn: 0,0013, Mo: 0,00005 y Zn: 0,0002. De acuerdo con la cantidad de calcio, de magnesio y de potasio contenidos en la solución, se adicionó la cantidad de aluminio, de tal manera que se lograra una relación $(Ca+Mg+K)/Al$ equivalente a 1; 0,75 y 0,5. Esta relación es uno de los criterios para definir como tóxica, una concentración determinada de aluminio en la solución del suelo (Instituto Colombiano Agropecuario, 1992). Como control, se utilizó la solución nutritiva sin la adición de aluminio. Como fuente de aluminio, se empleó $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ (Riedel-de Haën ®, Alemania). En todos los tratamientos, incluso el control, el pH de la solución se ajustó a 5,5, mediante la adición de NaOH o HCl 0,1 N. Los contenedores, se cubrieron con papel de aluminio con el propósito de limitar el crecimiento de algas en la solución. Diariamente, se aireó la solución durante cinco minutos, con la ayuda de motores para acuario, para evitar condiciones de hipoxia en la solución.

La acidez en la solución nutritiva, se determinó por titulación con NaOH, hasta pH 7,2, determinado con potenciómetro. La longitud total de las raíces se midió seccionando cada una de las raíces de la planta y colocándolas en forma lineal sobre una placa de vidrio con papel milimetrado por debajo. Para visualizar mejor las raíces sobre la placa de vidrio, éstas se tiñeron con solución de safranina durante diez minutos y luego se enjuagaron con etanol al 70%. El peso seco de las raíces, se determinó con la ayuda de una estufa calibrada a 70°C durante 24 horas, hasta peso constante.

Se empleó un diseño estadístico completamente al azar con diez replicaciones por tratamiento. Los resultados obtenidos, se analizaron mediante una tabla ANOVA para determinar la significancia. La diferencia entre promedios, se calculó con la prueba Tukey ($P < 0,05$). Los

análisis estadísticos, se realizaron con la versión 11.5 de SPSS (Statistical Package for the Social Sciences - SPSS, Inc., Chicago, Illinois).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas que se expusieron a la solución nutritiva con aluminio no mostraron una sintomatología clara en las hojas como consecuencia de la toxicidad por el elemento; sin embargo, en las raíces, los síntomas del efecto negativo del Al fueron bastante claros. Es así como mientras las plantas control presentaban raíces filamentosas, largas y delgadas, en las plantas expuestas al metal, las raíces se hacían más gruesas y cortas en la medida que la relación $(Ca+Mg+K)/Al$ tenía un valor más reducido (Figura 1).



Figura 1. Apariencia externa de las raíces de plantas de coliflor (*B. oleracea* var. Botrytis) expuestas a diferentes concentraciones de aluminio en la solución nutritiva.

Se encontró que la longitud total de las raíces se redujo en proporciones de 25,7, 29,7 y 53,5 % para los tratamientos con relación bases / Al equivalentes a 1, 0,75 y 0,5, respectivamente, en relación con las plantas control (Figura 2). En este caso, se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) entre los tratamientos.

La variable peso seco de las raíces no mostró diferencias significativas, a pesar de lo cual, se notó un incremento entre 25 y 28% del peso seco encontrado en las raíces de las plantas expuestas a Al, en comparación con las plantas control.

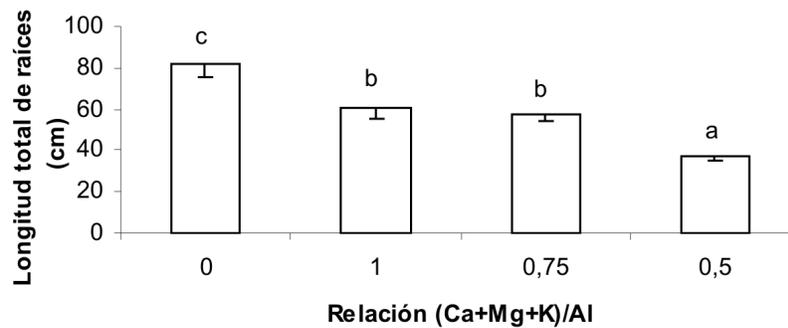


Figura 2. Longitud total de las raíces en plantas de coliflor (*B. oleracea* var. *Botrytis*) expuestas a diferentes concentraciones de aluminio.

El efecto de las altas concentraciones de aluminio sobre el crecimiento y el desarrollo radicales debería estar asociado a alteraciones en los mecanismos que determinan la división celular, por tanto, si se tiene en cuenta que los ciclos celulares en los meristemos de las raíces duran aproximadamente entre 18 y 24 horas (Gunning & Steer, 1996) es poco probable que la reducción de la división celular sea la responsable de la inhibición tan rápida del crecimiento radical, efecto que se expresa a partir de la primera hora de exposición de las raíces a aluminio. Sin embargo, una inhibición sustancial en el crecimiento de las raíces, que se extiende a lo largo de horas, e incluso días, tendría que estar asociada con la reducción de la multiplicación celular (Lazof & Holland, 1999).

Es muy posible que una de las causas de la reducción en la mitosis de meristemos radicales sea una consecuencia de alteraciones inducidas por el aluminio en las moléculas del material genético (Matsumoto, 1991) y, en general, en el núcleo de las células meristemáticas de raíces, pues se ha encontrado que en genotipos sensibles a aluminio, éste se acumula en mayor cuantía y con más rapidez que en materiales tolerantes (Silva *et al.* 2000). Por tanto, los desórdenes causados tanto en el núcleo de las células como en el material genético tendrían como consecuencia alteraciones en la mitosis, pues es indiscutible el papel protagónico que el ADN y el núcleo tienen en la mitosis.

En relación con la apariencia externa anormal exhibida por las raíces de coliflor que se expusieron a aluminio, se ha encontrado que algunos compuestos que inhiben el funcionamiento normal del citoesqueleto, inhiben

también el crecimiento y además dan una apariencia anormal al ápice radical, similar a la inducida en las raíces por la fitotoxicidad por aluminio. En general, muchos factores que contribuyen a la alteración del crecimiento de raíces ocasionan una reorientación en los microtúbulos del citoesqueleto. Por lo tanto, la inhibición del crecimiento y el incremento anormal del diámetro radical que se presenta en las raíces expuestas a aluminio, hacen pensar en el citoesqueleto como un objetivo celular en casos de fitotoxicidad por aluminio (Baskin *et al.* 1994; Baluška *et al.* 1996; Baskin & Wilson, 1997; Casierra-Posada, 2002). Es así que la presencia de raíces cortas y gruesas en las plantas estudiadas, como consecuencia del aluminio, sería un síntoma de fitotoxicidad por el metal, máxime, cuando las especies de Brásicas manifiestan una alta sensibilidad a la acidez y a la presencia de aluminio en el sustrato (Clune & Copeland, 1999; Anoop *et al.* 2003).

Otro efecto negativo de la modificación en la apariencia externa de las raíces de las plantas expuestas a aluminio es que al hacerse éstas más gruesas se reduce considerablemente el área de contacto de la epidermis con la solución del suelo, limitando así la toma de agua y de nutrientes, con lo cual, la expresión del potencial productivo de las plantas se vería seriamente comprometido.

Los valores de pH medidos en la solución, antes de la titulación, se modificaron como consecuencia de la concentración de Al en la solución, de manera que el valor de esta variable se redujo en cantidades de 6,42%, 25,7% y 27,34% en comparación con el valor encontrado en la solución de las plantas control, para los tratamientos con

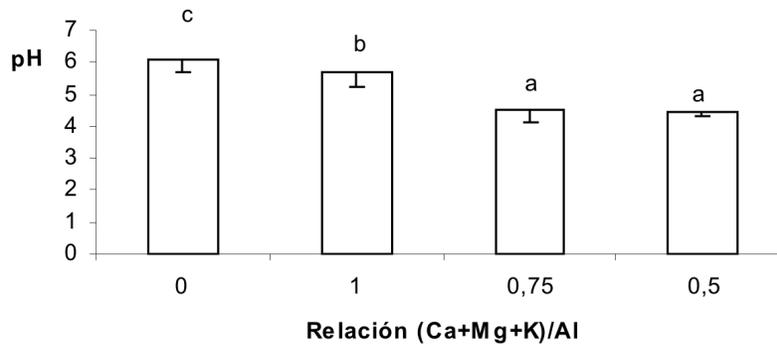


Figura 3. Valor del pH previo a la titulación en la solución nutritiva de plantas de coliflor (*B. oleracea* var. *Botrytis*) expuestas a diferentes concentraciones de aluminio en la solución nutritiva.

una relación bases/Al de 1, 0,75 y 0,5 (Figura 3). Se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) entre los tratamientos.

La acidez titulable expresada en porcentaje de ácido málico presente en la solución nutritiva donde crecieron las plantas, se incrementó en proporción inversa al valor de la relación bases/Al (Figura 4). Esta variable mostró diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) entre las diferentes concentraciones de Al en la solución.

Los resultados muestran claramente que luego de ajustar el pH a un valor de 5,5, se encontró una reducción en el valor del pH, inversamente proporcional a la cantidad de $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$, adicionado a la solución nutritiva, lo cual se pudo deber a la liberación de protones luego de reaccionar el sulfato de aluminio con los compuestos

de la solución nutritiva y el agua. El aluminio en condiciones ácidas aparece principalmente como $Al(OH_2)_6^{3+}$ (denominado comúnmente Al^{3+}) (Scheffer & Schachtschabel, 1992; Marschner, 1995); sin embargo, sería difícil entender la naturaleza de la reacción del sulfato de aluminio con los componentes de la solución nutritiva. En cualquier caso, la reducción del pH de la solución permitió la liberación de formas tóxicas de aluminio que causaron alteraciones en el desarrollo de raíces. Las reacciones del aluminio con los componentes del sustrato son muy complejas y se han desarrollado algunos modelos para comprenderlos, como el modelo gibsita y el modelo de complejos con humus (Simonsson, 2000), no obstante, parece ser que la relación de intercambio H^+/Al^{3+} , es decir, el número de protones consumidos por la fase sólida en el proceso de liberación de Al^{3+} es determinante, cuando se trata de un sustrato sólido; sin

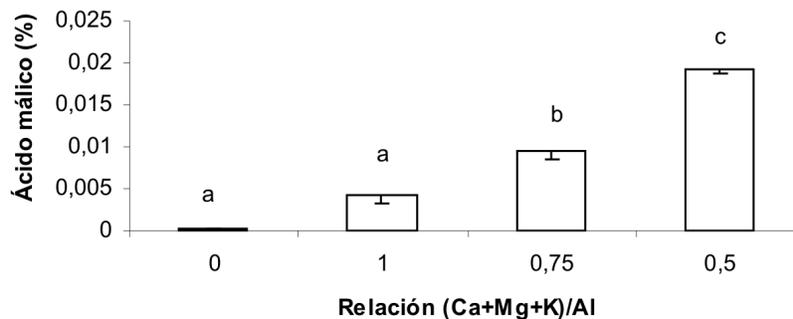


Figura 4. Acidez titulable expresada como porcentaje de ácido málico, determinada en la solución nutritiva de plantas de coliflor (*B. oleracea* var. *Botrytis*) expuestas a diferentes concentraciones de aluminio.

embargo, dado que en el presente ensayo, se utilizó una solución aireada es muy difícil determinar el origen de los protones que motivaron el descenso del pH.

Como consecuencia de la reducción del pH en la solución, el aluminio se hace activo y se convierte en un elemento altamente tóxico para las células vegetales, a lo cual, las plantas responden liberando ácidos orgánicos que contribuyen a reducir los efectos tóxicos del aluminio sobre las células, como sucede en *Brassica napus* con la exudación de ácido cítrico en respuesta al contenido de aluminio en el sustrato (Anoop *et al.* 2003). Se ha encontrado que la exudación de ácidos orgánicos en plantas, como reacción a la presencia de aluminio, se considera un mecanismo determinante para desarrollar tolerancia a este metal tóxico (Ma, 2000). En este proceso intervienen canales transportadores de aniones, un tipo de proteína presente en la membrana que regulan la secreción de ácidos mediante la activación de los canales por interacción directa del aluminio ya sea con el canal proteico o con un receptor específico en la membrana (Delhaize & Ryan, 1995; Ma *et al.* 2001; Piñeros & Kochian, 2001).

La acidez titulable de la solución en la que crecieron las plantas estuvo en relación directamente proporcional con la cantidad de $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$, adicionado a la solución. Lo cual permite la posibilidad de que las plantas reaccionaran exudando una mayor cantidad de ácidos orgánicos en respuesta al contenido de aluminio en la solución, a medida que el valor de pH se hacía más bajo.

Como consecuencia de la reducción del pH en las soluciones que contenían aluminio, el crecimiento y el desarrollo de las raíces, se vieron seriamente afectados, mostrando una alta sensibilidad de las plántulas de coliflor a la presencia de aluminio en el sustrato.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se desarrolló con el apoyo de la Dirección de Investigaciones (DIN) de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, en el marco del plan de trabajo del grupo de investigación Ecofisiología Vegetal, adscrito al programa de Ingeniería Agronómica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. Además, los autores

agradecen la colaboración del ingeniero Hugo Ferney Sáenz, representante de Inpulse semillas, por el suministro del material vegetal para la realización del ensayo, así como al equipo de trabajo del laboratorio Bioplasma, de la UPTC por su colaboración en la realización de las mediciones.

BIBLIOGRAFÍA

- ANOOP, V.M.; BASU, U.; McCAMMON, M.T.; McALISTER-HENN, L.; TAYLOR, G.J. 2003. Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol.* 132:2205-2217.
- BALUŠKA, F.; BARLOW, P.W.; VOLKMANN, D. 1996. Complete desintegration of the microtubular cytoskeleton precedes auxin-mediated reconstruction in postmitotic maize root cells. *Plant Cell Physiol.* 37:1013-1021.
- BASKIN, T.I.; WILSON, J.E. 1997. Inhibitors of protein kinases and phosphatases alter root morphology and disorganize cortical microtubules. *Plant Physiol.* 113:493-502.
- BASKIN, T.I.; WILSON, J.E.; CORK, A.; WILLIAMSON, R.E. 1994. Morphology and microtubule organization in *Arabidopsis* roots exposed to oryzalin or taxol. *Plant Cell Physiol.* 35:935-942.
- BULANOVA, N.V.; SYNZYNYNS, B.I.; KOZ'MIN, G.V. 2004. Aluminum induces chromosome aberrations in cells of wheat root meristem. *Russ. J. Genet.* 37(12):1455-1458.
- BLOOM, P.R. 1981. Phosphorus adsorption by an aluminum-peat complex. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45:267-272.
- CASIERRA-POSADA, F. 2001. Fundamentos fisiológicos, bioquímicos y anatómicos del estrés por aluminio en vegetales. *Revista COMALFI.* 28(2):8-19.
- CASIERRA-POSADA, F. 2002. Alteraciones inducidas por aluminio en el citoesqueleto de las plantas. *Revista COMALFI.* 29(2):23-30.

- CLUNE, T.S.; COPELAND, L. 1999. Effects of Al on canola roots. *Plant Soil*. 216:27-33.
- De CRISTOFARO, A.; HE, J.Z.; ZHOU, D.H.; VIOLANTE, A. 2000. Adsorption of phosphate and tartarate on hydroxi-aluminum-oxalate precipitates. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 64:1347-1355.
- DELHAIZE, E.; CRAIG, S.; BEATON, R.J.; BENNET, R.J.; JAGADISH, V.C.; RANDALL, P.J. 1993. Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) I. Uptake and distribution of aluminium in root apices. *Plant Physiol.* 103:685-693.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. 1995. Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* 107:315-321.
- FOX, T.R.; COMERFORD, N.B. 1990. Low-molecular-weight organic acids in selected forest soils of southeastern USA. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43:647-678.
- GUNNING, B.E.S.; STEER, M.W. 1996. *Plant cell biology: Structure and function*. Jones and Bartlett ediciones, Sudbury, MA. 130p.
- HAYNES, R.J.; SWIFT, R.S. 1989. The effects of pH and drying on adsorption of phosphate by aluminum-organic matter associations. *J. Soil Sci.* 40:773-781.
- HEIM, A.; BRUNNER, I.; FREY, B.; LÜSTER, J. 2001. Root exudation, organic acids and element distribution in roots of Norway spruce seedlings treated with aluminium in hydroponics. *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* 164:519-526.
- HOEKENGA, O.A.; MARON, L.G.; PIÑEROS, M.A.; CANCADO, G.M.; SHAFF, J.; KOBAYASHI, Y.; RYAN, P.R.; DONG, B.; DELHAIZE, E.; SASAKI, T.; MATSUMOTO, H.; YAMAMOTO, Y.; KOYAMA, H.; KOCHIAN, L.V. 2006. AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 20, 103(25):9738-9743
- HORST, W.J.; KLOTZ, F. 1990. Screening soybean for aluminum tolerance and adaptation to acid soils. En: El Basam *et al.* eds. Genetic aspects of plant mineral nutrition. Kluwer Academic Publ. p.355-360.
- HORST, W.J.; WAGNER, A.; MARSCHNER, H. 1983. Effect of aluminium on root growth, cell division rate and mineral element contents in roots of *Vigna unguiculata* genotypes. *Z. Pflanzenphysiol.*, 109:95-103.
- HUANG, P.M.; VIOLANTE, A. 1986. Influence of organic acids on crystalization and surface properties of precipitation products of aluminum. En: Huang, P.M.; Schnitzer, M. eds. Interactions of soil minerals with natural organics and microbes. SSSA Spec. Publ. Madison. p.159-221.
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. 1992. Fertilización en diversos cultivos, quinta aproximación. Produmedios. Bogotá. 64p.
- JOHNSON, P.A.; BENNET, R.J. 1991. Aluminium tolerance of root cap cells. *J. Plant Physiol.* 137:760-762.
- LAZOF, D.B.; HOLLAND, M.J. 1999. Evaluation of the aluminum-induced root growth inhibition in isolation from low pH effects in *Glycine max*, *Pisum sativum* and *Phaseolus vulgaris*. *Aust. J. Plant Physiol.* 26:147-157.
- LIAO, H.; WAN, H.; SHAFF, J.; WANG, X.; YAN, X.; KOCHIAN, L.V. 2006. Phosphorus and aluminum interactions in soybean in relation to aluminum tolerance. Exudation of specific organic acids from different regions of the intact root system. *Plant Physiol.* 141(2):674-84.
- MA, J.F. 2000. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell Physiol.* 41(4):383-390.
- MA, J.F.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. 2001. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 16:273-278.
- MARSCHNER, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2ª ed.; Academic Press, Londres. p.606-613.

- MATSUMOTO, H. 1991. Biochemical mechanism of the toxicity of aluminum and the sequestration of aluminum in plant cells. En: Wright, R.J.; Baligar, V.C; Murrmann, R.P. eds. Plant-Soil Interactions at Low pH. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p.825-838
- MATSUMOTO, H.; MORIMURA, S. 1980. Repressed template activity of chromatin of pea roots treated by aluminium. *Plant Cell Physiol.* 21:951-959.
- PIÑEROS, M.A.; KOCHIAN, L.V. 2001. A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al^{3+} -induced anion channels. *Plant Physiol.* 125:292-305.
- RENGEL, Z. 1992. Disturbance of cell Ca^{2+} homeostasis as a primary trigger of Al toxicity syndrome. *Plant, Cell and Environmental*, 15:931-938.
- SARKAR, A.N., JENKINS, D.A.; WIN JONES, R.G. 1979. Modifications to mechanical and mineralogical composition of soil within the rhizosphere. En: Harley, J.L.; R., Scott Russel, R.eds. The soil-root interface. Academic Press, San Diego. p.125-136.
- SCHEFFER, F.; SCHACHTSCHABEL, P. 1992. Lehrbuch der Bodenkunde. Editorial Enke, Stuttgart (Alemania). p.113-125.
- SILVA, I.R.; SMYTH, T.J.; MOXLEY, D.F.; CARTER, T.E.; ALLEN, N.S.; RUFFY, T.W. 2000. Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip: Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. *Plant Physiol.* 123:543-552.
- SIMONSSON, M. 2000. Interactions of aluminium and fulvic acid in moderately acid solutions: Stoichiometry of the H^+/Al^{3+} exchange. *Eur. J. Soil Sci.* 51:655-666.
- VANCE, G.F.; STEVENSON, F.J.; SIDRA, F.J. 1996. Environmental chemistry of aluminum-organic complexes. En: Sposito, G., ed. The environmental chemistry of aluminum. CRC Press, Lewis Publ. Boca Raton, Florida. p.169-220.
- VASQUEZ, M.D.; POSCHENRIEDER, C.; CORRALES, I.; BARCELLO, J. 1999. Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. *Plant Physiol.* 119:435-444.
- VIOLANTE, A.; GIANFREDA, L. 1995. Adsorption of phosphate on variable charge minerals: Competitive effects and ligands. En: Huang, P.M. *et al.* eds. Environmental impacts of soil component interactions, Vol. II, Metals, other inorganics, and microbial activities. CRC Press, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. p.29-37
- VIOLANTE, A.; HUANG, P.M. 1989. Influence of oxidation treatments on surface and reactivities of short range ordered products of aluminum. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53:1402-1407.
- YANG, J.L., ZHANG, L.; LI, Y.Y.; YOU, J.F.; WU, P.; ZHENG, S.J. 2006. Citrate transporters play a critical role in aluminium-stimulated citrate efflux in rice bean (*Vigna umbellata*) roots. *Ann. Bot. (Inglaterra)* 97(4):579-584.

Recibido: Febrero 8 de 2007

Aceptado: Mayo 17 de 2007

LA COMUNIDAD FITOPLANCTÓNICA EN EL EVENTO DE SURGENCIA FRENTE AL MAR CARIBE CENTRO COLOMBIANO

PHYTOPLANKTON COMMUNITY IN THE UPWELLING EVENT OFF CENTRAL COLOMBIAN CARIBBEAN SEA

Andrés Franco-Herrera ¹
Eduardo Andrés Torres-Sierra ²

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la estructura de la comunidad fitoplanctónica bajo la condiciones de surgencia y no surgencia en la costa central del Caribe colombiano y establecer su condición frente a este tipo de eventos oceanográficos a escala regional, se adelantaron cuatro muestreos siguiendo el método Eureliano, entre los meses de julio a septiembre de 2006 en la columna de agua (0-50m), dos en condiciones de surgencia y los restantes en no surgencia. Se evaluó la composición, la abundancia, la dominancia y la diversidad fitoplanctónica a partir de muestras obtenidas con botella Van Dorn y arrastres horizontales. Se encontró que el grupo dominante fueron las diatomeas, específicamente las especies de los géneros *Skeletonema*, *Chaetoceros*, *Coscinodiscus* y *Thalassionema*, con densidades superiores a 50 cel/L. No se detectaron claras diferencias en

la composición específica fitoplanctónica bajo las dos condiciones oceanográficas, pero sí mayores densidades de células en ausencia de surgencia. Ecológicamente, el fitoplancton se caracterizó por una alta riqueza de especies y una baja dominancia, lo que se reflejó en una alta diversidad. Desde esta perspectiva, el fitoplancton, en el sistema de surgencia analizado, se constituye en una comunidad análoga a aquellas que se encuentran en las grandes surgencias permanentes de borde occidental de los continentes.

Palabras claves: surgencia, fitoplancton, diversidad, diatomeas.

SUMMARY

To evaluate the structure of the phytoplankton community under upwelling and non-upwelling conditions in the Colombian central Caribbean coast and to establish its conditions, compared with similar oceanographic events on a regional scale, four samples, taken between July and September 2006, two in upwelling and two in non-upwelling condition, were carried out along the water column (0-50m) following the Eurlian method. Water samples with the Van Dorn bottle and horizontal tows were taken to determine phytoplankton composition, density, dominance and diversity. It was found that diatoms were the dominant group, specifically species of the genera *Skeletonema*, *Chaetoceros*, *Bacteriastrium* and *Thalassionema*, showing densities higher than 50cel/L.

¹ Biólogo Marino, Doctor Oceanografía, Profesor Titular, Programa de Biología Marina, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Sede Santa Marta. Carrera 2 No. 11-68, Edificio Mundo Marino, El Rodadero, Santa Marta. PBX: +(57) 5 4229334. e-mail: andres.franco@utadeo.edu.co.

² Estudiante tesista, Programa de Biología Marina, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Sede Santa Marta. Carrera 2 No. 11-68, Edificio Mundo Marino, El Rodadero, Santa Marta. PBX: +(57) 5 4229334. e-mail: eduardotorres@fastmail.fm.

No clear differences were detected within the specific phytoplankton composition under both oceanographic conditions, but a higher cell density was evident for the non-upwelling one. From the ecological point of view, the phytoplankton is characterized by a high species richness, a low dominance and consequently by a high biodiversity. Thus, the phytoplankton community associated to the upwelling system of central Colombian Caribbean, emerges as an analog community to that found in the huge western permanent upwelling of the western border.

Key words: upwelling, phytoplankton, diversity, diatoms.

INTRODUCCIÓN

Las surgencias son afloramientos de aguas subsuperficiales llevadas hasta la superficie y removidas desde el área de transporte por el flujo horizontal (Bula-Meyer, 1990). Estos eventos pueden ocurrir en cualquier parte del océano, pero los más destacados se manifiestan a lo largo de las costas occidentales de los continentes, como se aprecia frente a California, Perú, Chile, Islas Canarias y Sudáfrica, regiones que se caracterizan por presentar una elevada producción pesquera (Barnes & Hughes, 1988; Lalli & Parsons, 1993). Esta alta producción secundaria está soportada por la comunidad fitoplanctónica, la cual se ve favorecida por la fertilización de nutrientes que han sido preformados en las capas profundas del océano y que por el evento de surgencia alcanzan la zona eufótica, generando un alto crecimiento celular y biomasa autotrófica. El fitoplancton, se constituye en la principal fuente de materia y energía de la red trófica marina pelágica, fortaleciendo principalmente las comunidades que dependen de este primer eslabón.

El departamento del Magdalena hace parte del sector central de la costa Caribe colombiana, presenta una franja costera amplia de 220km con diferentes ecosistemas que son afectados por la surgencia costera que se da en la región (CORPAMAG, 2004). Ésta, se encuentra modulada principalmente por la acción de los vientos Alisios del noreste que producen campos de vientos paralelos o perpendiculares a la línea de costa favoreciendo estos eventos de afloramiento, siendo especialmente significativos entre Punta Gallinas (Guajira) y Puerto Colombia (Atlántico, Bula-Meyer, 1990; Andrade & Barton, 2005). Este evento provoca cambios en las variables fisicoquí-

micas de la columna de agua, generándose estabilidades bajas o negativas, bajas temperaturas y salinidades altas. Desde el punto de vista químico, los niveles de nutrientes inorgánicos transportados verticalmente hacia la capa fótica son relativamente bajos, contrario a lo esperado, siendo esta la principal diferencia con las ya mencionadas surgencias de borde occidental. Al parecer, estaría dado a que las aguas de afloramiento tienen su origen en Aguas Intermedias del Atlántico Norte AIAN (Ramírez, 1983). Estas últimas, se caracterizan por presentar bajas concentraciones de compuestos inorgánicos, producto del patrón global de circulación termohalina del océano, cuyas aguas no han acumulado altas concentraciones de nutrientes producto de la remineralización de la materia orgánica en compuestos preformados (Libes, 1992). Durante un evento de surgencia es típico encontrar especies de crecimiento rápido (*i.e.* oportunistas), principalmente del microfitoplancton, como diatomeas de los géneros *Skeletonema*, *Chaetoceros*, *Bacteriastrium*, *Thalassionema* y *Pseudonitzschia* (Franco-Herrera, 2001; Tigreros, 2001). Es factible que especies de menor talla, como el pico- y nanofitoplancton, se puedan también ver incrementadas, sin embargo, por la dificultad de su identificación, especialmente en la resolución óptica, se pueden ver subestimadas.

El estudio de las comunidades marinas afectadas por el evento de surgencia frente a las costas del departamento del Magdalena en el Caribe colombiano es puntual y limitado a información secundaria. Las descripciones con que se cuentan, coinciden con la importancia del afloramiento sobre comunidades macroalgales pero no microalgales (Bula-Meyer, 1977, 1985; Díaz-Pulido & Garzón-Ferreira, 2002), principalmente durante la época seca de diciembre a abril donde se evidencia este evento oceanográfico en gran escala. No existe una valoración de los procesos sucesionales en la comunidad fitoplanctónica, los trabajos realizados en el departamento, se han centrado básicamente a la comparación de la biomasa fitoplanctónica entre los periodos secos y lluviosos (Franco-Herrera, 2001; Tigreros 2001, Barragán *et al.* 2003, Campos *et al.* 2004), sin describir su estructura específica durante el evento de surgencia.

El objetivo de esta investigación fue evaluar algunos atributos estructurales de la comunidad fitoplanctónica presente en el evento de surgencia costera que se da frente al departamento del Magdalena, Caribe colombiano, en el período julio a septiembre de 2006,

enriqueciendo de esta forma los registros que se poseen del área y comparando la estructura fitoplanctónica con otros focos de surgencias a nivel mundial (Álvarez *et al.* 1976, Rodríguez & Varela, 1987; Santander *et al.* 2003; Pizarro *et al.* 2005), para establecer el grado de similitud que poseen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. El departamento del Magdalena está ubicado en la zona centro del Caribe colombiano, comprende desde la desembocadura del río Magdalena hasta la desembocadura del río Piedras en el límite oriental del Parque Nacional Natural Tayrona (PNNT). Posee una gran variedad de ecosistemas marinos tanto de carácter estuarino, gracias a la Ciénaga Grande de Santa Marta (CGSM), como oceánicos, debido a las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta en el PNNT, que permiten la llegada de aguas oceánicas cerca de la costa (Ramírez, 1990).

El régimen climático regional está definido por la acción de los vientos Alisios y el movimiento de la Zona de Convergencia Intertropical (ZCIT), precisando en gran escala dos periodos climáticos, un seco de diciembre a abril y uno lluvioso de mayo a noviembre; en este último, se intercala, por lo general, una transición seca entre julio y agosto denominado "veranillo de San Juan" (Ramírez, 1990). La descarga continental es de los ríos Magdalena, Manzanares, Gaira y Piedra, principalmente y de la CGSM, produciendo fertilización en la capa de mezcla, con su mayor aporte al finalizar el periodo lluvioso (noviembre y diciembre).

Durante los meses de diciembre a abril y julio a agosto, se presentan las mayores velocidades de los vientos alisios en la región del departamento del Magdalena, superando los 4,0m/s (Franco-Herrera, 2005), con direcciones perpendiculares (120°), o paralelas (26°) a la línea de costa (Márquez, 1982). Estos campos de vientos, tanto de velocidad como de dirección, generan la suficiente tensión sobre la superficie del agua, permitiendo el desplazamiento mar afuera de las capas superficiales y el desarrollo de afloramientos de aguas profundas ya sea por acción de vientos continentales o por transporte de Ekman, si los vientos son perpendiculares o paralelos a la línea de costa, respectivamente. En cualquiera de las dos situaciones, las aguas de afloramiento corresponden

a las AIAN de profundidades cercanas o mayores a 100 m (Bula-Meyer, 1990).

Diseño muestral. Se siguió el método Eureliano para el estudio de la columna de agua, el cual consistió en evaluar en un punto fijo el comportamiento de las variables físicas, químicas y biológicas. Así, se realizaron cuatro muestreos en las coordenadas 11° 12' 30" N - 74° 15' 00" W, a 1mn al noroeste del Morro de Gaira, Caribe colombiano (Figura 1), entre los meses de julio a septiembre de 2006, específicamente en las fechas 26-07-2006, 15-08-2006, 01-08-2006 y 26-09-2006. Se escogió este lugar por encontrarse dentro de la zona de influencia de la surgencia, por presentar una profundidad mayor a 40m y por estar sometido directamente a la acción de los vientos alisios. En cada uno de los muestreos se realizaron dos ciclos, uno en la mañana y otro hacia el medio día, considerados original y réplica, tomando muestras de agua con botella Van Dorn a 0, 10, 20, 30, 40 y 50m de profundidad, con el fin de abarcar toda la capa de mezcla, ya que la termoclina permanente durante el periodo de estudio se encuentra entre los 40 y 45 m de profundidad (Blanco, 1988) y la penetración máxima de luz o zona fótica en la región alcanza cerca de los 50m (Franco-Herrera, 2005). De esta forma, se obtuvieron un total de 48 muestras de fitoplancton. Para establecer si los campos de vientos locales podrían o no favorecer surgencias, se trabajó con información satelital procesada del espectro de luz infrarrojo y visible del GOES-West y GOES-East para las variables humedad relativa y campos de vientos desde 600 a 950mb (CIMSS, 2006). Las muestras de agua obtenidas para cada profundidad fueron almacenadas en recipientes plásticos de 3L de capacidad, fijadas con solución de lugol (0,05% v:v) y refrigeradas en neveras de icopor. Así mismo, se realizaron arrastres verticales desde 50m hasta la superficie con una red cónica simple de poro de malla de 25µm, para complementar la composición fitoplanctónica presente. La identificación de células se realizó a nivel de género y especie, utilizando para ello un microscopio óptico de luz transmitida Nikon E200 con objetivos de 40x y 100x. Las guías empleadas fueron las de Cupp (1943), Vidal & Carbonell (1977), Balech (1988), Vidal (1995), Tigreros (2001) y Botes (2003).

La información, se organizó en una matriz de composición-abundancia por muestreo, la cual permitió describir la composición específica y por grupos mayores: diato-

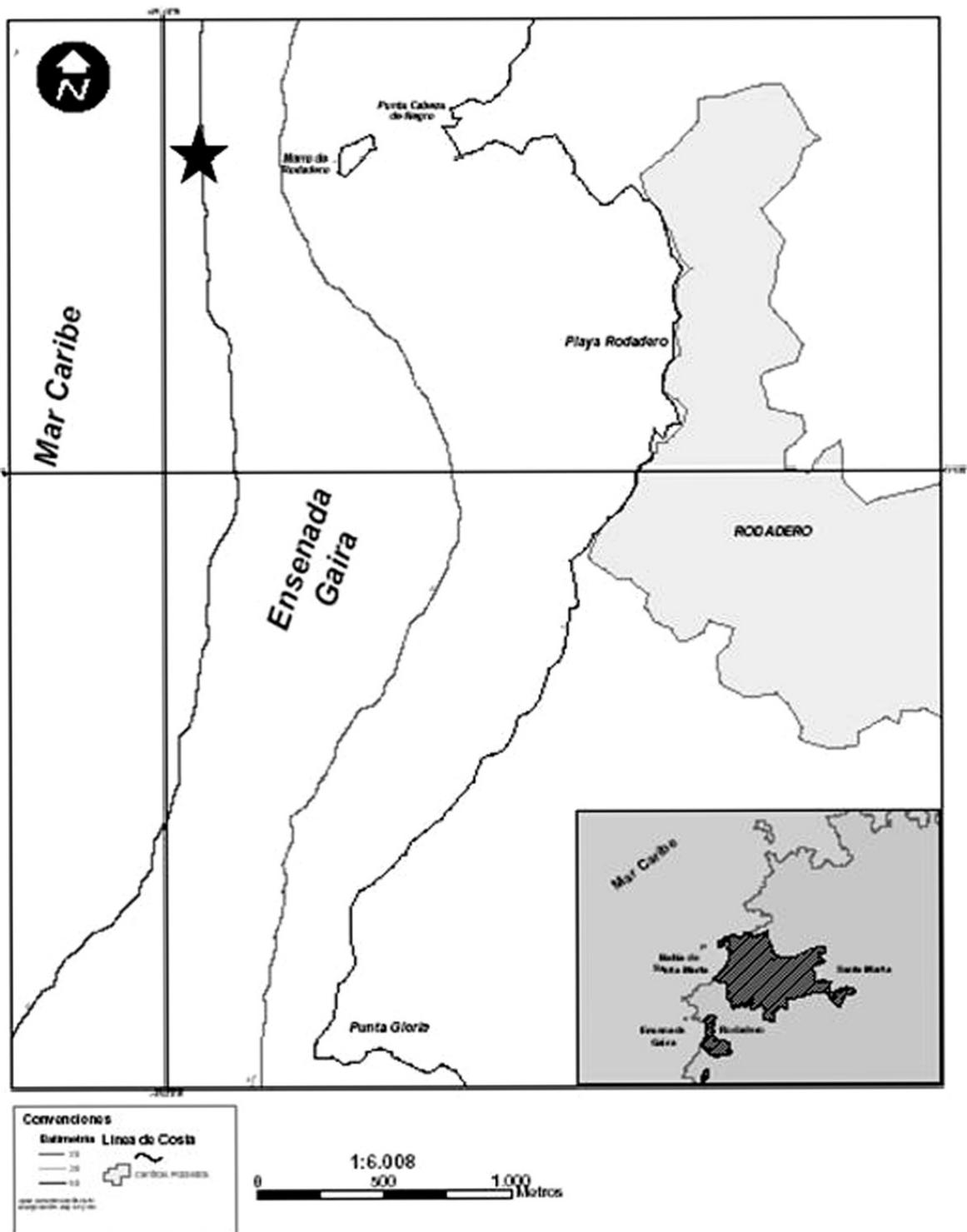


Figura 1. Ensenada de Gaira en el Caribe centro colombiano. La estrella indica las coordenadas del punto de muestreo donde se siguió el método Eurliano (Modificada de Franco-Herrera, 2005).

meas, dinoflagelados y cianobacterias. Igualmente, se calcularon los índices ecológicos de riqueza de especies, uniformidad de Pielou, diversidad de Shannon-Wiener y predominio de Simpson (Ramírez, 1999), con ayuda del paquete estadístico PRIMER 5 v.2,2 (Clarke, 1993).

Para detectar y describir la variación en la composición y la abundancia de la comunidad fitoplanctónica entre los muestreos, se realizaron análisis de clasificación cualitativos y cuantitativos, empleando los índices de similaridad de Jaccard y Bray-Curtis, respectivamente, usando como estrategia de ligamiento el promedio de grupos no ponderado (Clarke, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSION

La información obtenida para los campos de vientos del satélite permitió establecer que dos muestreos se realizaron durante eventos de surgencia en las fechas 26-07-2006 y 15-08-2006 y los dos restantes en no surgencia para los días 01-08-2006 y 26-09-2006 (Arévalo *et al.* en rev.). Para el 26-07-2006, se presentaron patrones de velocidad superiores a 4,5m/s y dirección del viento NE-SO, que favorecieron el desarrollo de un evento de surgencia costera en la zona por transporte de Ekman, dado que los vientos presentan una direccionalidad paralela a línea de costa (Figura 2a). Durante el segundo muestreo el 01-08-2006, el viento mantuvo la misma dirección, pero la velocidad disminuyó marcadamente a niveles menores a 2,0 m/s, lo que generó una inhabilidad en el evento de afloramiento costero (Figura 2b). Para el 15-08-2006, la velocidad del viento se intensificó hasta niveles de 4,0m/s y la dirección fue perpendicular a la línea de costa, es decir, vientos del continente hacia el mar, provenientes de los cañones que se forman por las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta, los que favorecen eventos de surgencia por acción de vientos continentales (Figura 2c). Finalmente, en el cuarto muestreo, el día 26-09-2006, la presencia de vientos del E-NE con baja velocidad, impidieron el afloramiento de aguas profundas (Figura 2d). Esta tendencia de vientos es típica para el área de estudio, la cual se caracteriza por presentar vientos del noreste, correspondientes a los Alisios cuyas mayores intensidades se dan hacia los períodos secos (Márquez, 1982; Andrade, 1993). Estos campos de vientos son variables en el área de estudio,

ya que la Sierra Nevada de Santa Marta causa flujos convergentes del aire del norte, noroeste y sureste con respecto a su eje principal (Kasakov *et al.* 1996), lo que hace que a nivel de la Ensenada de Gaira se puedan presentar vientos marinos paralelos o perpendiculares a la línea de costa que descienden hacia el mar en forma de un viento muy fuerte (brisa), pasando por el valle del río Piedras, el cerro de las Bóvedas, para llegar con especial intensidad hacia la Bahía de Santa Marta y la Ensenada de Gaira (Márquez, 1982).

Se identificaron un total de 86 especies fitoplanctónicas, correspondiendo el 53,4% a diatomeas centrales, 24,1% a diatomeas pennadas y 19,76% a dinoflagelados. Las cianófitas y las clorófitas representaron menos del 2% de la composición específica. Las diatomeas *Chaetoceros lacinosus*, *C. lorenzianus*, *Skeletonema costatum* y *Thalassionema nitzschooides* fueron las especies más abundantes y frecuentes a lo largo del estudio, con densidades superiores a 2000cel/L y frecuencias de aparición mayores al 65%. Dentro de los dinoflagelados, los géneros *Ceratium* y *Protoperidinium* fueron los más representativos, pero sus densidades no superaron las 6cel/L. De igual forma, las cianófitas y las clorófitas representadas por los géneros *Oscillatoria*, *Pediastrum* y *Scenedesmus*, presentaron una frecuencia de aparición baja con densidades menores a 5cel/L. Esta misma tendencia de especies representativas, se mantuvo al integrar las abundancias fitoplanctónicas en la columna de agua, de tal forma que las densidades específicas fluctuaron entre 2,5 y 12962,4cel/m² (Tabla 1).

Durante los eventos de surgencia (S), las especies fitoplanctónicas más abundantes y frecuentes a lo largo de la columna de agua fueron *Skeletonema costatum*, *Thalassionema nitzschooides*, *Chaetoceros lacinosus*, *C. lorenzianus*, *C. diversus*, *Coscinodiscus radiatus*. Estas mismas especies, fueron significativamente más abundantes y frecuentes durante la ausencia de surgencia (NS), además de *Asterionellopsis glacialis*, al punto que el 72% de la especies, se presentaron en los dos escenarios de muestreo (Tabla 1). Esto llevó a que el análisis de clasificación de presencia-ausencia de Jaccard mostrara una similaridad mayor al 60% en la mayoría de las muestras y a que se presentara una segregación parcial entre muestras obtenidas durante S y NS (Figura 3a).

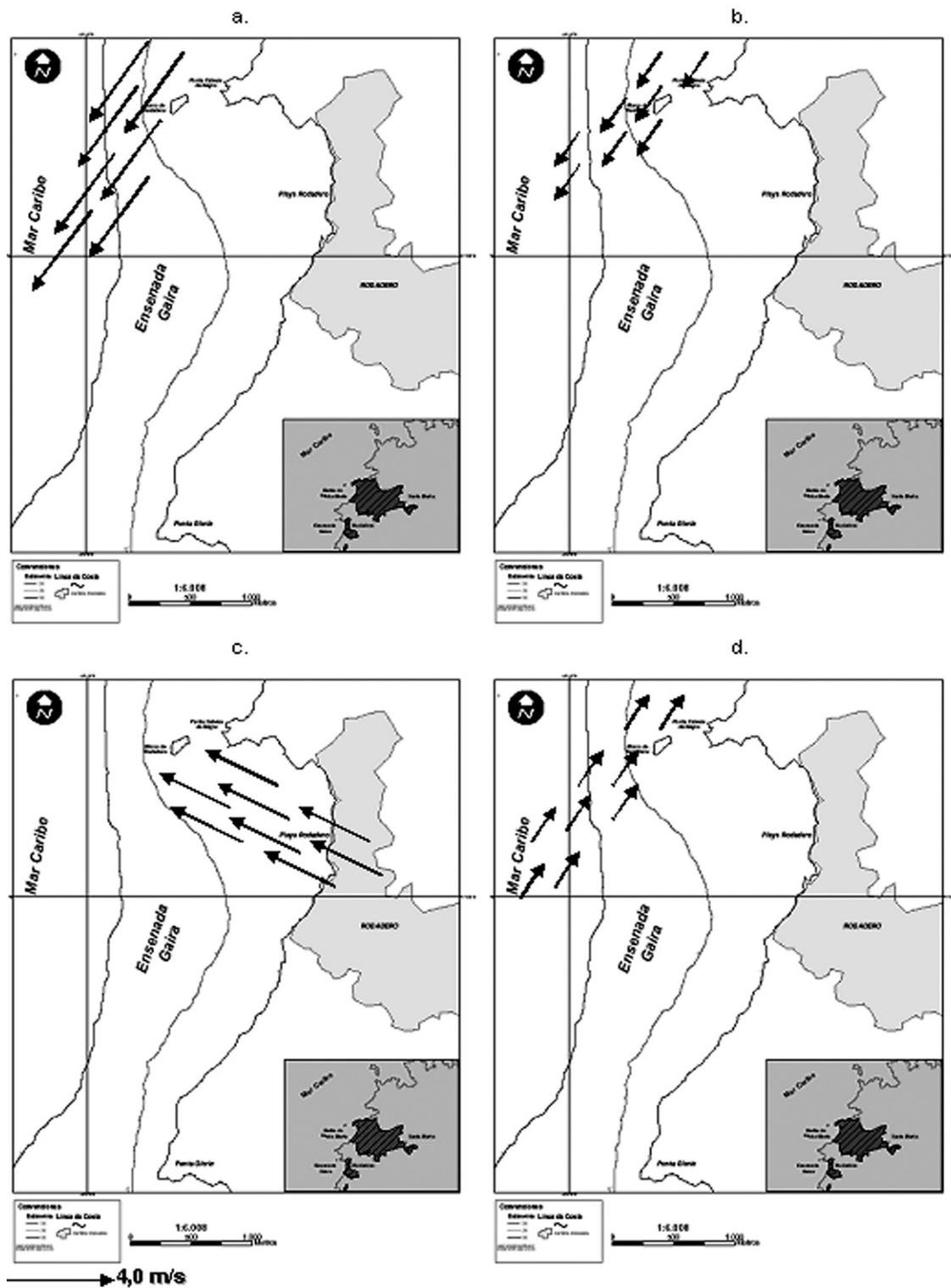


Figura 2. Campos de velocidad y dirección de vientos locales en la Ensenada de Gaira, Caribe colombiano, para los cuatro muestreos realizados entre los meses de julio y septiembre de 2006. a. 26-07-2006. b. 01-08-2006. c. 15-08-2006. d. 26-09-2006. Ensenada de Gaira en el Caribe centro colombiano.

Tabla 1. Composición y densidad celular fitoplanctónica integrada para la columna de agua (0-50m, cel/m²), para los muestreos realizados bajo condiciones de surgencia (S) y no surgencia (NS) en la plataforma continental en el Caribe centro colombiano. Números de 1-4, indican los ciclos totales realizados en cada condición oceanográfica.

Especie	S1	S2	S3	S4	NS1	NS2	NS3	NS4
<i>Hemiaulus hauckii</i>	2,2	5,8	12,6	1,2	147,7	1,0	26,2	1,5
<i>Hemiaulus sinensis</i>	2,1	7,6	15,2		55,0	131,3	1,6	
<i>Amphiprora gigantea</i>						5,0		
<i>Amphiprora alata</i>			2,0	1,5	5,0	15,0		
<i>Bacteriastrium comosum</i>	4,4	43,4	137,5	118,4	737,8	791,3	76,7	4,0
<i>Bacteriastrium delicatum</i>			91,6	185,7	162,7	255,0		2,5
<i>Chaetoceros affine</i>	112,7	78,7	656,7	457,2	3796,9	315,0	3,7	81,6
<i>Chaetoceros curvisetum</i>	35,3	37,6	178,9	171,2	4746,0	2777,5	28,3	
<i>Chaetoceros constrictus</i>	11,8	48,3	112,2	158,4	4181,6	1315,0	1,8	18,2
<i>Chaetoceros diversum</i>	4,0	35,7	944,2	714,7	1511,3	1616,3	184,2	14,3
<i>Chaetocero didymus</i>	15,2	3,0	39,6	222,9	3772,8	1932,5		
<i>Chaetoceros laciniosus</i>	657,7	2,6	2435,4	1997,7	12962,4	6961,3	246,3	159,2
<i>Chaetoceros lauderi</i>			455,5	218,8	712,5	115,0	263,5	118,8
<i>Chaetoceros leavis</i>			32,6	15,2	292,5	13,0		
<i>Chaetoceros lorenzianus</i>	21,9	24,4	2466,2	1526,4	7613,9	3632,5	33,7	356,8
<i>Chaetoceros pelagicus</i>		6,7						
<i>Chaetocero merranensis</i>			1,1	15,4	3,0	125,0		
<i>Chaetoceros peruvianum</i>	45,0	2,6	93,2	73,9	618,0	225,0	15,4	17,5
<i>Chaetoceros sp.</i>	7,3	45,6	84,9	19,6	157,6	11,0	17,9	15,4
<i>Corethron hyztrix</i>			18,0	1,3				
<i>Coscinodiscus gigas</i>	454,4	59,4	169,3	223,8	152,5	252,5	1,3	5,1
<i>Coscinodiscus granii</i>	13,3	11,5	325,7	355,3	427,9	395,0	73,2	67,9
<i>Coscinodiscus marginatus</i>				1,3				5,2
<i>Coscinodiscus radiatus</i>	773,7	627,2	414,9	262,4	182,8	517,5	86,0	2,6
<i>Stenophysis turris</i>			3,3					
<i>Lithodesmus undulatum</i>			66,6	25,6	12,6	4,0	5,1	5,6
<i>Odontella mobiliensis</i>	15,3	25,4	12,9	1,5	137,5	45,0		5,2
<i>Odontella sinensis</i>	15,1	22,5	17,8	1,1				
<i>Hemidiscus cuneiformis</i>	5,2	25,3	15,3	17,6	72,5	52,5		
<i>Leptocylindrus danyucus</i>	8,4	35,2	284,4	19,9	24,4	122,5	1,2	
<i>Guinardia flaccida</i>	5,2	25,8	87,0	1,1	212,6	12,5	72,0	39,1
<i>Ditylium brightwelli</i>				2,5	42,6			
<i>Stenophysis turris</i>					2,0			
<i>Rhizosolenia stolterfothii</i>	12,6	5,6	84,2	58,2	37,2	195,0	46,5	
<i>Rhizosolenia alata</i>	12,5	2,6	57,5	65,9	18,2	1,0	33,6	51,7
<i>Rhizosolenia fagglissima</i>				3,2	15,0			
<i>Rhizosolenia bergonii</i>	5,0	5,6						
<i>Rhizosolenia calcar-avis</i>		5,0	5,0	3,5	4,4	15,0	17,9	1,3
<i>Rhizosolenia castracanei</i>		5,8				5,0		
<i>Rhizosolenia hebetata</i>	5,0	2,5			3,0	5,0		5,3
<i>Rhizosolenia imbricata</i>		25,4	144,0	4,9	137,7	35,0	23,5	
<i>Rhizosolenia setigera</i>	15,4	5,8	137,3	99,0	182,5	132,5	5,1	2,9
<i>Rhizosolenia robusta</i>	12,5	15,1	15,4	1,2		1,0		1,5

Tabla 1. (Continuación)

Espece	S1	S2	S3	S4	NS1	NS2	NS3	NS4
<i>Thalassiothrix longissima</i>				5,3				
<i>Skeletonema costatum</i>	41,9	21,8	6577,5	5453,3	7721,5	65,0	1977,7	1489,4
<i>Asterionellopsis glacialis</i>	235,4	6,4	35,0		27,0	895,0		
<i>Climacosphenia moniligera</i>	2,5		15,0		37,5	25,0		
<i>Corethron hyztrix</i>				2,2				
<i>Grammatophora marina</i>			32,6	2,5	75,0			
<i>Synedra</i> spp.	27,6	25,4	87,8	17,7	5,0	9,0	5,1	5,2
<i>Thalassionema nitzschioides</i>	132,9	35,4	415,7	2994,4	4338,7	413,0	194,8	298,7
<i>Diploneis crabro</i>	17,5	17,5	5,0		15,0	27,5		
<i>Diploneis notabilis</i>			3,0		25,0	1,0	5,1	
<i>Gyrosigma</i> spp	35,1	15,3	56,5	25,4	52,5	147,5	5,1	5,2
<i>Playotropic lepidoptera</i>		5,8						
<i>Pleurosigma hamuleferum</i>					2,0	5,0		
<i>Pleurosigma elongatum</i>			61,6	22,6		9,0	5,5	
<i>Pleurosigma strigossum.</i>	12,7	17,7	144,3	43,4		45,0	5,1	1,5
<i>Pleurosigma nicobarium</i>					27,5			
<i>Pleurosigma</i> spp.	1,0	17,7	122,9	2,2	11,0	22,0	21,9	1,2
<i>Tropidoneis lepidoptera</i>			5,0	5,6				
<i>Trachyneis aspera</i>	1,4	22,8	2,0					
<i>Nitzschia closterium</i>	22,6	1,1	6,0		4,0	12,5	2,6	5,1
<i>Nitzschia longissima</i>	5,0	5,0	5,0					5,1
<i>Nitzschia pungens</i>	31,3	181,6	822,5	233,4	435,0	57,5	69,1	184,4
<i>Nitzschia sigma</i>	25,8	15,2				3,0	5,1	2,5
<i>Ornithocerus magnificus</i>			5,6	5,1				
<i>Dinophysis caudata</i>	5,6	5,6				2,0	5,5	5,2
<i>Pyrocystis robusta</i>					15,0	25,0		5,1
<i>Ceratium lineatum</i>		1,8						
<i>Ceratium carriense</i>			15,6		5,0	5,0		
<i>Ceratium fusus</i>		1,1	21,6	1,1		5,0	5,1	
<i>Ceratium inflatum</i>								1,5
<i>Ceratium massiliense</i>	1,0	5,8		2,5	47,5	2,0	7,7	
<i>Ceratium declinatum</i>							5,5	
<i>Ceratium ranipes</i>								5,3
<i>Ceratium setaceum</i>			5,6		4,0			
<i>Ceratium tenue</i>							5,1	
<i>Ceratium tripos</i>		2,5	1,0	5,7	7,5	15,0		5,2
<i>Ceratium vultus</i>								2,5
<i>Protoperidinium conicum</i>							41,3	1,5
<i>Protoperidinium divergens</i>							5,1	5,2
<i>Protoperidinium oceanicum</i>	5,0	1,8	32,1		7,5	32,5		41,2
<i>Pediastrum duplex</i>	22,7	25,4	5,6		2,0	55,0		16,0
<i>Scenedesmus opoliensis</i>	65,0		7,6	3,3		1,0		

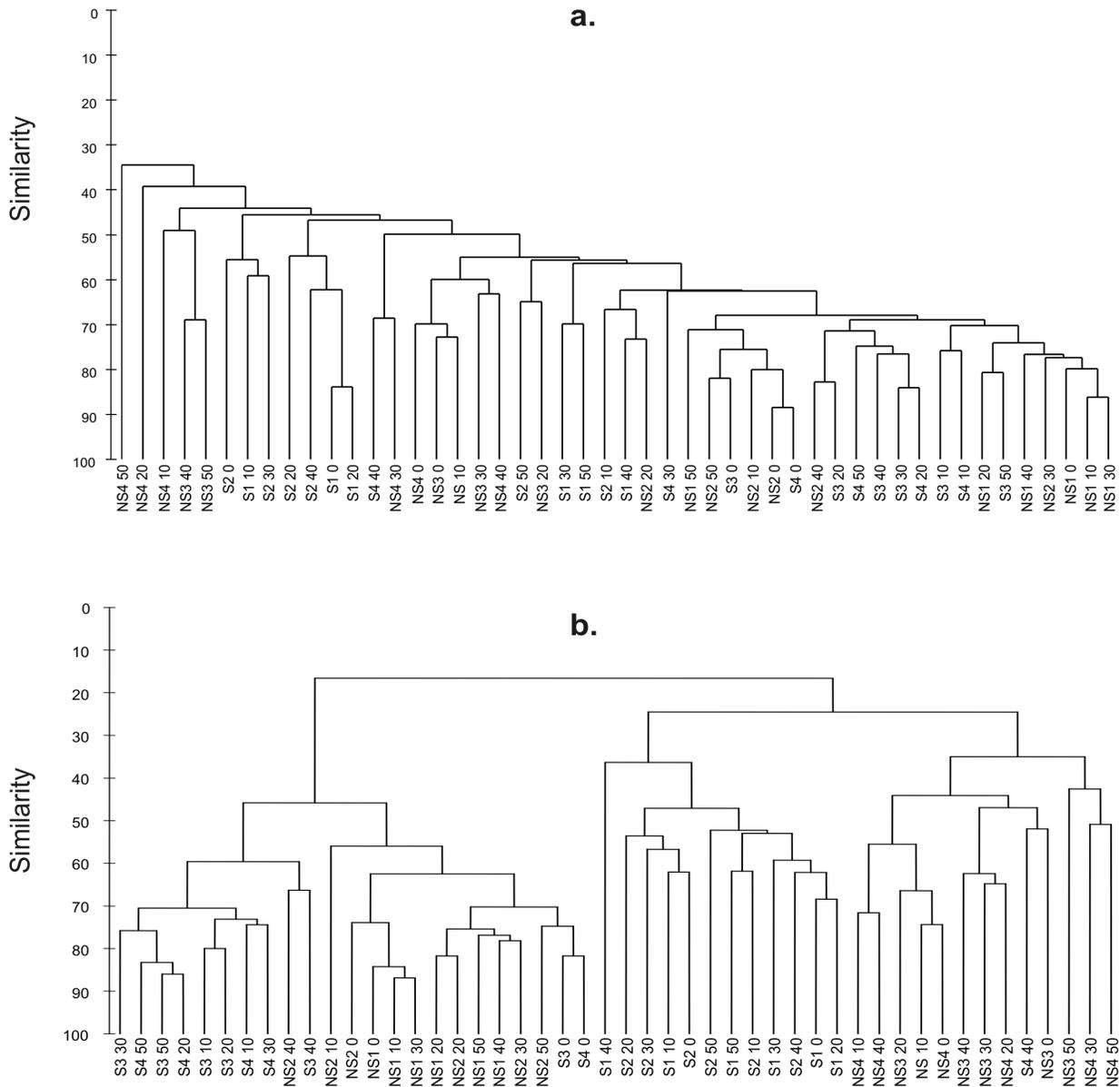


Figura 3. Análisis de clasificación cualitativo de Jaccard (a) y cuantitativo de Bray-Curtis (b) para muestras de fitoplancton obtenidas a diferentes profundidades en condiciones de surgencia (S) y no surgencia (NS) en la palataforma continental del Caribe centro colombiano. S ó NS + número + número = Surgencia o no surgencia + ciclo + profundidad.

Desde una perspectiva cuantitativa, la densidad promedio fitoplanctónica durante S fue de 234,25 +/- 48,54cel/L, fluctuando en un rango de 36,96 a 987,50 cel/L. Concentraciones más altas, se obtuvieron durante NS, donde la densidad promedio alcanzó los 473,15 +/- 97,19cel/L, variando entre 26,38 y 1497,16cel/L. Igual

comportamiento, se observó al integrar las densidades fitoplanctónicas en el estrato 0-50m, encontrándose que durante S las concentraciones estuvieron entre 2964,51 y 18110,05cel/m², mientras que en NS fueron superiores variando entre 3070,44 y 56007,49cel/m² (Tabla 2). Así, la principal diferencia entre los dos escenarios oceano-

gráficos fue principalmente el cambio de densidad fitoplanctónica en la columna de agua, más que un cambio drástico en la composición específica, lo cual es reflejado en el análisis de similaridad cuantitativo de Bray-Curtis, donde se detecta con mayor claridad la segregación de muestras entre S y NS, debido principalmente a los cambios de abundancia de las especies reportadas (Figura 3b). No obstante, las densidades encontradas son muy bajas comparadas con aquellas reportadas en otros sistemas de surgencia del Atlántico o Pacífico, donde la abundancia celular puede llegar a ser desde 100000 a 300000cel/L, como se presenta en los afloramientos de agua en la Bahía de Panamá (D’Croz *et al.* 1991) o alcanzar picos de hasta de 2’000.000cel/L, como sucede frente a las costas de Coruña en España (Casas *et*

al. 1999). Incluso, para todo el Atlántico suroccidental, incluyendo áreas de surgencia, las densidades pueden variar entre 25000 a 200000 cel/L (Olguín *et al.* 2006). Similar panorama se presenta en el Pacífico tropical, donde las densidades fitoplanctónicas pueden fluctuar entre 100000 a 326000cel/L (Ramírez *et al.* 2006), demostrando aún más la baja densidad fitoplanctónica en el área de estudio. Sin embargo, las concentraciones son similares a aquellas presentes en diferentes regiones de la gran cuenca del Caribe, donde la abundancia celular puede fluctuar entre 180 a 1000cel/L, como sucede en la plataforma continental de Jamaica (Webber & Roff, 1996) o desde 46 hasta 422cel/L en el arco de las Antillas, en el Caribe oriental (Marshall, 1973).

Tabla 2. Atributos estructurales y ecológicos de la comunidad fitoplanctónica encontrada durante muestreos bajo condiciones de surgencia y no surgencia en la plataforma continental en el Caribe centro colombiano. R = riqueza de especies, δ = uniformidad de Pielou, H = Diversidad de Shannon-Wiener, λ = Predominio de Simpson. M+número+letra = Muestreo+número+ciclo.

	Surgencia				No surgencia			
	M1a	M1b	M2a	M2b	M1a	M1b	M2a	M2b
R	45	52	59	52	55	58	41	43
Densidad (cel/m ²)	2964,91	1682,87	18110,05	15873,03	56007,49	23908,00	3636,99	3070,44
δ	0,75	0,74	0,61	0,60	0,65	0,65	0,57	0,59
H	2,87	2,91	2,50	2,35	2,59	2,66	2,13	2,20
λ	0,09	0,10	0,15	0,17	0,11	0,10	0,27	0,24
Géneros representativos		<i>Chaetoceros,</i> <i>Coscinodiscus,</i> <i>Rhizozolenia,</i> <i>Skeletonema,</i> <i>Thalassionema</i>				<i>Chaetoceros,</i> <i>Coscinodiscus,</i> <i>Rhizozolenia,</i> <i>Skeletonema,</i> <i>Thalassionema,</i> <i>Asterionellopsis</i>		

La riqueza de especies encontrada es cercana a la reportada para otras regiones costeras del mundo donde se presentan eventos de surgencia. Santander *et al.* (2003), indican una riqueza de 87 especies en la zona costera de Iquique, entre Punta Cavanha y Bajo Molle en el Pacífico chileno, mientras que Ochoa & Tarazona (2003) identificaron 106 especies, de las cuales 68 fueron diatomeas y 38 dinoflagelados en la Bahía In-

dependencia, Perú. De manera análoga, D’Croz *et al.* (1991) encuentran 55 especies en Bahía Panamá bajo condición de surgencia. Ahora bien, la dominancia de las diatomeas en número de especies y abundancias celulares, constituye la característica típica de una comunidad de ambientes de surgencia costera (Santander *et al.* 2003), ajustándose el Caribe centro colombiano a esta condición. Estudios previos ya había indicado esta

tendencia, mostrando como especies dominantes a las diatomeas de los géneros *Skeletonema*, *Chaetoceros*, *Bacteriastrium*, *Thalassionema* y *Pseudonitzschia*, específicamente en el Golfo de Salamanca y el Parque Nacional Natural Tayrona (PNNT), zona influenciada por la surgencia costera del Caribe centro (Franco-Herrera, 2001; Tigreros, 2001). Incluso, es análogo a resultados obtenidos en otros focos de surgencia del Caribe colombiano, como lo es la Península de la Guajira, donde las abundancias relativas más altas corresponden a diatomeas de los géneros *Bacteriastrium*, *Chaetoceros* y *Rhizosolenia* (Duarte, 1996). Así mismo, en costas chilenas, se ha reportado como especie dominante a *Thalassiosira subtilis*, constituyente del orden centrales, mientras que en la plataforma peruana especies como *Skeletonema costatum* y *Thalassionema nitzschioides* son las dominantes (Santander *et al.* 2003; Ochoa & Tarazona, 2003).

La presencia de un alto número de especies de diatomeas de los géneros *Chaetoceros* o la abundante presencia de *Skeletonema costatum* o *Thalassionema nitzschioides* responde a que sus células, de un tamaño promedio de 20 μm , se encuentran embebidas en un mucílago, formando grandes agrupaciones. Hutchings *et al.* (1995) han señalado que las diatomeas que forman cadenas o colonias, con rangos de tamaño entre 5 y 30 μm , pueden tener una mayor habilidad para explotar escenarios de surgencia costera, ya que mantienen una alta eficiencia en términos de captación de luz, incorporación de nutrientes y crecimiento, dado que cada célula conserva su individualidad viéndose favorecida por una mayor relación superficie/volumen (Santander *et al.* 2003).

La diversidad calculada varió entre 2,13 y 2,91, sin encontrarse diferencias entre las comunidades fitoplanctónicas presente en S y NS. En ningún muestreo, se encontró el predominio de una especie o grupo de especies ($\lambda < 0,27$, Tabla 2), indicando así que la columna de agua alberga una comunidad altamente rica en especies, donde si bien algunos géneros presentan altas densidades, estas son contrarrestadas por un alto número de especies con abundancias similares. Esto hace que la uniformidad (δ) encontrada sea superior al 56% en todos los casos (Tabla 2). Si bien los valores de diversidad pueden provenir de una composición específica variada, los rangos acá encontrados son similares

a los reportados para comunidades fitoplanctónicas en focos de surgencia de la región norte y sur de Chile, donde se puede llegar a un valor de 2,5 (Santander *et al.* 2003; Pizarro *et al.* 2005). Tendencias similares se han encontrado en áreas del Pacífico colombiano, en cuyo foco de surgencia la diversidad puede llegar a los 2,5 ó 3,0 (Mora, 1993; Sánchez, 1996). Pinilla & Peña (2002) indican que el análisis de varias comunidades fitoplanctónicas de diferentes áreas oceánicas del Caribe, el Mediterráneo y el Atlántico Noroeste de África, han proporcionado una extensa serie de valores de diversidad, los cuales fluctúan entre 2,4 y 2,6, es decir, que aquellos encontrados en esta investigación se ajustan en su mayoría a la condición regional de la cuenca del Caribe y Atlántico, incluso superando el rango máximo en muestreos bajo condiciones de surgencia.

En conclusión, la comunidad fitoplanctónica que se desarrolla en el ecosistema de surgencia durante el período agosto-septiembre de 2006 frente a las costas del departamento del Magdalena, se caracteriza por una alta riqueza de especies, principalmente de diatomeas centrales y pennadas, con una baja densidad fitoplanctónica y predominancia, así como una alta diversidad específica. La estructura comunitaria es similar a aquella encontrada en otros focos de surgencia alrededor del mundo en el borde occidental de los continentes. En ausencia de surgencia, el fitoplancton presente en la columna de agua del sector no difiere composicionalmente con aquel presente durante los afloramientos de agua, pero es evidente un incremento en la densidad celular, producto principalmente de la fertilización con nutrientes traídos por los aportes continentales. Se recomienda para futuros estudios en este tipo de ecosistema pelágico evaluar la sucesión fitoplanctónica cubriendo la época seca de diciembre a abril, cuando se da el evento de surgencia en una mayor escala temporal, realizando muestreos sistemáticos en la columna de agua cada hora, con el fin de tener una aproximación más detallada de la composición y la biodiversidad. Así mismo, estimar las concentraciones de carbohidratos y de proteínas fitoplanctónicas, para establecer su importancia alimenticia a las comunidades herbívoras del ecosistema pelágico, considerando así tanto la cantidad como la calidad nutricional de esta comunidad autotrófica.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo estuvo enmarcado dentro del Proyecto "Dinámica física, química y planctónica de la surgencia costera frente al Departamento del Magdalena, Caribe colombiano", del Programa de Biología Marina y la Dirección de Investigaciones de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano (UJTL), quien financió la totalidad del estudio (Código 315R). Los autores agradecen al personal de la UJTL por su apoyo en la ejecución de la investigación, a Adolfo Sanjuan Muñoz, M.Sc., por su ayuda en la revisión del documento y asesoría en campo y a los evaluadores anónimos, cuyos apreciaciones ayudaron a enriquecer y mejorar el manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ, S.; LARA, J.R.; ACOSTA, M. 1976. Parámetros relacionados con la productividad orgánica primaria en dos antiestuarios de Baja California. California. Cooperative Oceanic Fisheries Investigations. Reports Volume XIX: 84-88.
- ANDRADE, C.A. 1993. Análisis de la velocidad del viento en el mar Caribe. Bol. Cient. CIOH. 13:33-43.
- ANDRADE, C.A.; BARTON, E.D. 2005. The Guajira upwelling system. Continental Shelf Research. 25 (9):1003-1022.
- ARÉVALO, D.L., FRANCO-HERRERA, A. en rev. Características oceanográficas de la surgencia frente a la Ensenada de Gaira, Departamento del Magdalena. Sometido a: Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras.
- BALECH, E. 1988. Los dinoflagelados del Atlántico sudoccidental. Publicaciones especiales. Instituto Español de Oceanografía. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. 310p.
- BARNES, R.S.K.; HUGHES, R.N. 1988. An introduction to marine ecology. Balckwell Science. Oxford. 351p.
- BARRAGÁN, R.G.; MALDONADO, F.; NIETO, S.; FRANCO-HERRERA, A. 2003. Relación de la biomasa fitoplanctónica con la dinámica fisicoquímica y meteorológica de la capa de mezcla en la Bahía de Gaira, Caribe colombiano, durante el período Agosto-Noviembre de 2.003. Informe final. Sem. Invest. Fac. Biología Marina. U. de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Santa Marta. 57p.
- BLANCO, J.A. 1988. Las variaciones ambientales estacionales en las aguas costeras y su importancia para la pesca de la región de Santa Marta, Caribe colombiano. Tesis de Maestría. Depto. Biología. Fac. de Ciencias. U. N. de Colombia. Santa Marta. 62p.
- BOTES, L. 2003. Phytoplankton Identification Catalogue. Saldanha Bay, South Africa, April 2001. GloBallast Monograph. Series No. 7. IMO London. 77p.
- BÜLA-MEYER, G. 1977. Algas marinas bénticas indicadoras de un área afectada por aguas de surgencia frente a la costa Caribe colombiana. An. Inst. Inv. Mar. Punta de Betín. 9:45-71.
- BÜLA-MEYER, G. 1985. Un núcleo nuevo de surgencia en el Caribe colombiano detectado en correlación con las macroalgas. Bol. Ecotrópica. 14:3-20.
- BÜLA-MEYER, G. 1990. Oceanografía: 100-113. En: FEN- COLOMBIA. Caribe Colombia. Bogotá. 264p.
- CAMPOS, E.M.; OREJARENA, J.; PALOMINO, M.; FRANCO-HERRERA, A. 2004. Dinámica de la biomasa fitoplanctónica en la capa de mezcla y su relación con la oceanometeorología de la Bahía de Gaira, Caribe colombiano. Fase II: Febrero - Mayo de 2004. Informe final. Sem. Invest. Fac. Biología Marina. U. de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Santa Marta. 53p.
- CASAS, B.; VARELA, M.; BODE, A. 1999. Seasonal succession of phytoplankton species on the coast of A Coruña (Galicia, northwest Spain). Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 15(1-4):413-429.
- CIMSS (COOPERATIVE INSTITUTE FOR METEOROLOGICAL SATELLITE STUDIES). 2006. Tropical cyclones information. U. Wisconsin-Madison. Disponible desde Internet en: <http://cimss.ssec.wisc.edu/tropic/>. (con acceso: 26/07/06, 01/08/06, 15/08/06, 26/09/06).

- CORPAMAG (CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DEL MAGDALENA). 2004. Informe general del Departamento del Magdalena. Disponible desde Internet en: www.corpamag.gov.co/departamento.htm (con acceso 10/0504).
- CLARKE, K. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* (18):117-143.
- CÚPP, E. 1943. Marine plankton diatoms of the west coast of North America. *Bull. Scripps Inst. Oceanography. U. California. La Jolla, California.* 238p.
- D'CROZ, L.; DEL ROSARIO, J.; GOMEZ, J. 1991. Upwelling and phytoplankton in the Bay of Panama. *Rev. Biol. Trop.* 39(2):233-241.
- DÍAZ-PULIDO, G.; GARZÓN-FERREIRA, J. 2002. Seasonality in algae assemblages on upwelling-influenced coral reefs in the Colombian Caribbean. *Botánica Marina.* 45:284-292.
- DUARTE, G. 1996. Estructura del fitoplancton al noroeste de la Guajira, durante el crucero Caribe 1993. Tesis de Grado. Fac. Biología Marina. U. de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Santa Marta. 98p. + anexos.
- FRANCO-HERRERA, A. 2001. Estrategias de ingestión y flujo de carbono entre fitoplancton y *Eucalanus* spp. (Copepoda: Calanoidea) en dos ambientes oceanográficos del Caribe central colombiano. Centro de Investigaciones Científicas. Fac. Biología Marina. U. de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Santa Marta. 67p.
- FRANCO-HERRERA, A. 2005. El Rodadero, más allá que un centro turístico. Una aproximación a la oceanografía de la Ensenada de Gaira. *Servigraphics Ltda. Bogotá.* 58p.
- HUTCHINGS, L., PITCHER, G.; PROBYN, T.; BAILEY, G. 1995. The chemical and biological consequences of coastal upwelling. En: Santander, E.; Herrera, I.; Merino, C. 2003. Fluctuación diaria del fitoplancton en la capa superficial del océano durante la primavera de 1997 en el norte de Chile (20°18'S): II. Composición específica y abundancia celular. *Rev. Biol. Mar. Oceanografía.* 38(1):13-25.
- KASAKOV, A.L., LEZHENIN, A.A., SPERANSKIY, L.S. 1996. Resultados preliminares del estudio de la capa límite mesometeorológica de la atmósfera en la costa norte colombiana aplicando un modelo numérico. *Bol. Cient. CIOH.* 17:17-26.
- LALLI, C.M.; PARSONS, T.R. 1993. *Biological oceanography. An introduction.* Pergamon Press. Oxford. 301p.
- LIBES, S.M. 1992. *An introduction to marine biogeochemistry.* John Wiley and Sons, Inc. Toronto. 734p.
- MÁRQUEZ, G. 1982. Los sistemas ecológicos marinos del sector adyacente a Santa Marta, Caribe colombiano I: Generalidades. *Ecol. Trop.* 2(1):5-18.
- MARSHALL, H.G. 1973. *Phytoplankton Observations in the Eastern Caribbean Sea.* *Hydrobiologia.* 41(1):45-55.
- MORA, M.E. 1993. Contribución al conocimiento de los dinoflagelados de las zonas de surgencia oceánica y costera, durante condiciones anómalas de temperatura en el Pacífico colombiano (marzo-abril, 1992). Tesis de Grado. Fac. Biología Marina. U. de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Cartagena. 41p.
- OCHOA, N.; TARAZONA, J. 2003. Variabilidad temporal de pequeña escala en el fitoplancton de Bahía Independencia, Pisco, Perú. *Rev. Peru. Biol.* 10(1):59-66.
- OLGUÍN, H.F.; BOLTOVSKOY, D.; LANGE, C.B.; BRANDINI, F. 2006. Distribution of spring phytoplankton (mainly diatoms) in the upper 50 m of the South-western Atlantic Ocean (30-61°S). *J. Plank. Res.* 28(12):1107-1128
- PINILLA, G.; PEÑA, V. 2002. Composición, distribución y abundancia de la comunidad fitoplanctónica de la ensenada de Utría, Pacífico colombiano. *Revi. Biol. Mar. y Oceanografía.* 37(1):67-81.
- PIZARRO, G.; MONTECINO, V.; GUZMÁN, L.; MUÑOZ, V.; CHACÓN, V.; PACHECO, H.; FRANGÓPULOS,

- M.; RETAMAL, L.; ALARCÓN, C. 2005. Patrones locales recurrentes del fitoplancton en fiordos y canales australes (43°-56° S) en primavera y verano. *Cienc. Tecnol. Mar.* 28(2):63-83.
- RAMÍREZ, D.G.; GIRALDO, A.; TOVAR, J. 2006. Producción primaria, biomasa y composición taxonómica del fitoplancton costero y oceánico en el Pacífico colombiano (septiembre-octubre 2004). *Invest. Mar.* 34(2):211-216.
- RAMÍREZ, G. 1983. Características fisicoquímicas de la Bahía de Santa Marta (Agosto, 1980- Julio, 1981). *An. Inst. Inv. Mar. Punta de Betín.* 13:111-121.
- RAMÍREZ, G. 1990. Distribución de los nutrientes inorgánicos en las aguas costeras de la región de Santa Marta, Caribe colombiano. *Memorias VII Seminario Nacional de Ciencias y Tecnologías del Mar. Comisión Colombiana de Oceanografía:* p.244-254.
- RAMÍREZ, A. 1999. Ecología aplicada. Diseño y análisis estadísticos. U. Jorge Tadeo lozano. Centro editorial Escuela Colombiana de Ingeniería. Bogotá D.C. 325p.
- RODRÍGUEZ, C.; VARELA, R. 1987. Pigmentos clorofílicos e hidrografía en la región noroccidental de Venezuela con énfasis en el Golfo de Venezuela. *An. Inst. Inv. Mar. Punta de Betín.* 17:3-14.
- SÁNCHEZ, E. 1996. Caracterización espacial del fitoplancton nerítico en el Pacífico colombiano durante julio-agosto de 1994. Tesis de grado Fac. Ciencias. Universidad del Valle. Cali. 60p.
- SANTANDER, E.; HERRERA, L.; MERINO, C. 2003. Fluctuación diaria del fitoplancton en la capa superficial del océano durante la primavera de 1997 en el norte de Chile (20°18´S): II. Composición específica y abundancia celular. *Rev. Biol. Mar. y Oceanografía. Chile.* 38(1):13-25.
- TIGREROS, P.C. 2001. Biodiversidad y bioquímica del fitoplancton marino asociado a ambientes mesotróficos y oligotróficos del Golfo de Salamanca, Caribe colombiano. Tesis de grado. Fac. Biología Marina. U. de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Santa Marta. 173p. + anexos.
- VIDAL, L.A.; CARBONELL, M.C. 1977. Diatomeas y dinoflagelados de la Bahía de Cartagena. Tesis de grado. Fac. Biología Marina. U. de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá. 360p.
- VIDAL, L.A. 1995. Estudio del fitoplancton en el sistema lagunar estuarino tropical Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia, durante el año 1987. Tesis de Maestría. Depto. Biología. Fac. Ciencias. U. N. de Colombia. Santa Marta. 207p.
- WEBBER, D.F.; ROFF, J.C. 1996. Influence of Kingston Harbor on the phytoplankton community of the nearshore hellshire coast, southeast Jamaica. *Bull. Mar. Sc.* 59(2):245-258.

Recibido: Febrero 28 de 2007.

Aceptado: Mayo 15 de 2007