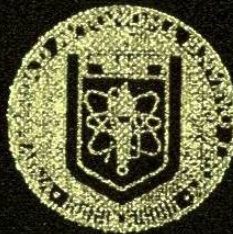


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ESTUDIOS HEMATOLOGICOS Y BIOQUIMICOS  
EN MODELOS EXPERIMENTALES DE MIOTONIA.

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN BIOLOGIA CELULAR.

POR

Q.B.P. ZACARIAS JIMENEZ SALAS

MONTERREY, N. L.

AGOSTO DE 1987.

TM

Z5320

FCB

1987

J5



1020066499

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**RECEBIDO**  
SET. 14 1987

FRMA



DIRECCION GENERAL DE  
ESTUDIOS DE POSTGRADO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



ESTUDIOS HEMATOLOGICOS Y BIOQUIMICOS  
EN MODELOS EXPERIMENTALES DE MIOTONIA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OPTAR AL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN BIOLOGIA CELULAR

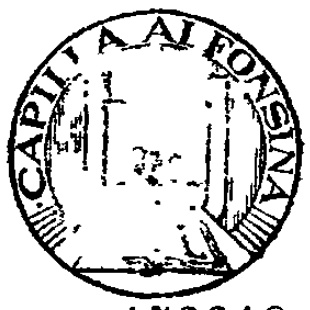
POR

Q B P ZACARIAS JIMENEZ SALAS

MONTERRÉ, N. L.

AGOSTO DE 1987

TM  
ZS320  
FCB  
1987  
JS



153318

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

ESTUDIOS HEMATOLOGICOS Y BIOQUIMICOS EN  
MODELOS EXPERIMENTALES DE MITONIA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL  
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
BIOLOGIA CELULAR

POR

Q.B.P. ZACARIAS JIMENEZ SALAS

COMISION DE TESIS

APROBADA:

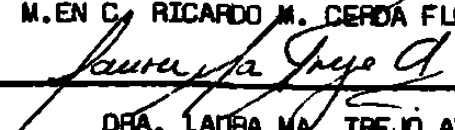
DIRECTOR:

  
\_\_\_\_\_  
DR. RAUL GARZA CHAPA


SECRETARIO:

\_\_\_\_\_  
M. EN C. RICARDO M. CERDA FLORES

VOCAL:

  
\_\_\_\_\_  
DRA. LAURA M. TREJO AVILA

DIRECTOR EXTERNO:

  
\_\_\_\_\_  
DR. ANTONIO MORALES AGUILERA

MONTERREY, N. L.

AGOSTO DE 1987

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de la División de Farmacología de la Unidad de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la asesoría del Dr. Antonio Morales Aguilera



Dr. Antonio Morales Aguilera

Director Externo



## DEDICATORIA

A mis padres:

Sr. ZACARIAS JIMENEZ GUAJARDO

Sra. MARIA DEL REFUGIO SALAS DE JIMENEZ

Que son la base fundamental de mi existencia

A mis hermanas:

L.A.F. MARIA ANTONIETA y

Dra. SANJUANA DE LA PAZ

Por el cariño fraternal que nos une

A mi esposa ELVIRA PEREZ y

mi hija JESSICA YAZMIN

Porque su amor, paciencia, comprensión y  
confianza, siguen siendo lo más esencial

A mis familiares y amigos

## AGRADECIMIENTOS

A la Unidad de Investigación Biomédica del Noreste IMSS, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Al Dr. G. Antonio Morales Aguilera, por la oportunidad brindada, la confianza, la crítica y el estímulo que depositó en mí que contribuyeron a mi formación académica.

Al Dr. Raúl Garza Chapa, por el apoyo académico y científico otorgado para el desarrollo y culminación de esta tesis y de mi formación de Postgrado.

Al Biol. M. en C. Ricardo M. Cerda F. por formar parte de la comisión de tesis y por el apoyo intelectual brindado durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Laura Ma. Trejo A. por formar parte de la comisión de tesis y otorgar sus críticas acertadas para una mejor culminación de esta investigación.

Al Dr. Salvador L. Said F. por su valiosa colaboración en la fase inicial del trabajo experimental que hizo posible la elaboración del mismo.

Al Q.B.P. Jacinto Careaga O., Q.F.B. Carolina Trujillo Gzz., Sr. Rafael Gámez V. y J. Leticia Trevino T., personal del laboratorio donde se realizó este trabajo, por su colaboración y compañerismo durante el desarrollo del mismo.

A la Q.B.P. Adriana Sampayo Reyes, por su colaboración en el trabajo experimental de esta tesis.

Al M.C.P. J. Antonio Luna de la Rosa por su amable disposición para la elaboración del trabajo gráfico que ilustra este escrito.

Al M.V.Z. Arturo Guerrero M., Sr. Mateo Trejo T. y Sr. Francisco Reséndiz, personal del bioterio de la Unidad, por las facilidades otorgadas.

A todas y cada una de las personas que de una forma u otra colaboraron para la realización de este trabajo.

## I N D I C E

	Pág.
<u>RESUMEN</u> - - - - -	1
<u>INTRODUCCION</u> - - - - -	4
I. Objetivos - - - - -	5
<u>ANTECEDENTES</u> - - - - -	6
I. El Síndrome miotónico - - - - -	6
A. Generalidades - - - - -	6
B. Modelos Farmacológicos de Miotonía - - - - -	8
C. Bioquímica de Eritrocitos - - - - -	11
II. Electroforesis en geles de placa de poliacrilamida - - - - -	12
III. Hipótesis de trabajo - - - - -	13
<u>MATERIALES</u> - - - - -	14
I. Origen de los reactivos - - - - -	14
II. Material biológico - - - - -	15
III. Equipo - - - - -	15
<u>MÉTODOS</u> - - - - -	17
I. Preparaciones experimentales - - - - -	17
A. Preparación de las Soluciones - - - - -	17
B. Inducción Farmacológica de Miotonía - - - - -	17
II. Pruebas hematológicas - - - - -	18
A. Hemoglobina - - - - -	18
B. Hematócrito - - - - -	19

	Pág.
III. Pruebas bioquímicas - - - - -	19
A. Glucosa - - - - -	19
B. Proteínas Séricas Totales - - - - -	20
C. Colesterol Total - - - - -	21
IV. Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida de proteínas de membranas de eritrocitos - - - - -	21
A. Aislamiento de las Membranas Eritrocíticas - - - - -	21
B. Proteínas Totales - - - - -	22
C. Electroforesis en Geles de Placa - - - - -	23
V. Análisis estadístico - - - - -	26
<u>RESULTADOS</u> - - - - -	30
I. Descripción de los animales afectados - - - - -	30
II. Pruebas hematológicas - - - - -	31
A. Hemoglobina - - - - -	31
B. Hematócrito - - - - -	31
III. Pruebas bioquímicas - - - - -	32
A. Glucosa - - - - -	32
B. Proteínas Séricas Totales - - - - -	32
C. Colesterol - - - - -	33
III. Electroforesis en geles planos - - - - -	33
<u>DISCUSION</u> - - - - -	45
I. Inducción experimental de miotonía - - - - -	45
II. Pruebas hematológicas - - - - -	46

	Pág.
III. Pruebas bioquímicas - - - - -	47
A. Glucosa - - - - -	47
B. Proteínas Séricas Totales - - - - -	48
C. Colesterol - - - - -	49
IV. Electroforesis en geles de placa - - - - -	50
<u>CONCLUSIONES</u> - - - - -	53
<u>LITERATURA CITADA</u> - - - - -	54

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

	Pág.
1. Diagrama general de flujo de los procedimientos empleados - -	27
2. Equipo utilizado para realizar la electroforesis - - - - -	28
3. Representación esquemática de las principales proteínas de membranas de eritrocitos de humano - - - - -	29
4. Animal con miotonía experimental - - - - -	35
5. Niveles de hemoglobina de los animales de experimentación - -	37
6. Niveles de hematócrito de los animales de experimentación - -	38
7. Niveles de glucosa de los animales de experimentación - - - -	39
8. Niveles de proteínas totales de los animales de experimen tación - - - - -	40
9. Niveles de colesterol de los animales de experimentación - - -	41
10. Electroforetogramas de proteínas de membranas de eritrocitos de las ratas miotonizadas experimentalmente - - - - -	43
11. Perfiles densitométricos de los electroforetogramas de proteí nas de membranas de eritrocitos de las ratas miotonizadas experimentalmente - - - - -	44
 CUADRO I. Resultados de las determinaciones hematológicas y bioquímicas efectuadas a ratas miotonizadas experimen talmente - - - - -	 36
 CUADRO II. Resultados del análisis de varianza aplicado a las determinaciones hematológicas y bioquímicas reali zadas a los animales miotonizados experimentalmente -	 42

## RESUMEN

La miotonía es un síndrome muscular hereditario que también puede ser inducido en animales de laboratorio mediante la administración de ciertos agentes químicos. Aunque el músculo es el principal órgano blanco en las enfermedades que cursan con miotonía, se supone que el defecto molecular responsable de este síndrome se encuentra generalizado a diversas membranas biológicas y no confinado únicamente al sarcolemma. De ahí que en la mayoría de las investigaciones bioquímicas acerca de la enfermedad se utilicen membranas de eritrocitos que son una fuente fácilmente accesible para la obtención de membranas libres de contaminantes citoplasmáticos.

Entre los agentes farmacológicos más utilizados para la producción experimental de miotonía figuran el ácido 9-antracencarboxílico (9-AC) y el 20,25-Diazacolesterol (20,25-D).

Este trabajo se hizo con la finalidad de conocer y comparar algunas condiciones hematológicas y bioquímicas y del perfil electroforético de proteínas de membranas eritrocíticas de animales miotonizados farmacológicamente con los agentes arriba mencionados y de asociar estos cambios a la producción experimental de miotonía. Para ello, se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de 40 días de nacidas que se separaron en tres grupos de cinco animales cada uno. El primer grupo recibió diariamente y por vía oral el 9-AC (32 mg/kg) disuelto en propilenglicol, a otro grupo se le administró por la misma vía el 20,25-D (50 mg/kg) disuelto en agua y un tercer grupo recibió únicamente propilenglicol (volumen máximo 0.3 ml) y se mantuvo como testigo. A los 40 días de iniciado el experimento, los animales se sacrificaron, previo ayuno de 16 horas, y se obtuvieron muestras de sangre completa y suero.



Se utilizaron métodos comunes de análisis clínicos para determinar hemoglobina, hematócrito, proteínas séricas totales, glucosa y colesterol. De las muestras de sangre total se tomaron alícuotas que se prepararon para hacer electroforesis en geles discontinuos al 5 y 8% de SDS-poliacrilamida utilizando el método de Laemmli.

Se encontró que el 9-AC ocasionó sólo una ligera disminución del hematócrito y no se observaron cambios significativos en los niveles de hemoglobina, proteínas séricas totales, glucosa y colesterol.

En los animales tratados con el 20,25-D se observaron disminuciones en los niveles sanguíneos de hemoglobina, hematócrito y colesterol y no hubo variaciones significativas en los niveles séricos de proteínas totales o de glucosa.

Cabe indicar que aunque no fueron estadísticamente significativas las diferencias en los niveles de glucosa sanguínea de los animales miotonizados y del grupo testigo, los primeros mostraron una clara tendencia a la hipoglicemia.

Las alteraciones hematológicas y bioquímicas observadas en los animales con miotonía experimental probablemente son consecuencia de efectos colaterales de los fármacos y no se relacionan con el síndrome miotónico ya que no se han encontrado en la miotonía de origen natural ni se observaron asociados con la intensidad de la miotonía en este estudio.

No se encontraron cambios en las proteínas de membranas eritrocíticas de ratas miotonizadas con el 20,25-D por medio de la electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, lo que sugiere que las anomalías en las funciones enzimáticas encontradas por otros autores en mem-

branas eritrocíticas de animales tratados con este fármaco se relacionan con alteraciones en el microambiente membranal más que con cambios proteicos cuantitativos.

Por otro lado, en el perfil proteico de membranas eritrocíticas de animales tratados con el 9-AC sí se observaron algunas alteraciones en las bandas polipeptídicas, a saber: 1) disminuciones en la intensidad de las bandas en las regiones de 26,000 y 29,000 daltones de peso molecular, y 2) incrementos en la intensidad de las bandas polipeptídicas que se desplazan en las regiones de 59,000 y 135,000 daltones. Esto sugiere una relación funcional y/o estructural entre los polipéptidos que integran estas bandas y los del canal aniónico del eritrocito, aunque no se puede descartar que este efecto del 9-AC sea colateral al síndrome miotónico.

## INTRODUCCION

Las miopatías son un grupo de desordenes que afectan a los músculos de hombres y animales. Pueden ser adquiridas en el transcurso de la vida, como la mioglobulinuria esporádica y la miastenia gravis, o ser de origen genético como la distrofia muscular de tipo Duchenne entre otras.

Uno de los grandes problemas de la fisiopatología actual lo constituye el cómo estudiar las miopatías hereditarias, ya que cuando la enfermedad se diagnostica por los métodos convencionales de laboratorio, generalmente se encuentra en un estado muy avanzado. Además, es difícil contar con controles adecuados para seguir el desarrollo de la miopatía en el hombre o su reversibilidad con técnicas experimentales. Consecuentemente, se ha desarrollado una amplia variedad de modelos de enfermedades musculares humanas. Cabe mencionar que la importancia de estos modelos no estriba en que sean idénticos a los desordenes humanos, sino en que el conocimiento de su mecanismo podría llevar al entendimiento del fenómeno básico de la patología muscular y a través de ello a la aclaración de los procesos distróficos en el hombre.

Entre los modelos de miopatías se incluyen enfermedades musculares que ocurren espontáneamente en ciertas líneas altamente puras de ratones, cabras y otros animales. Además, una área que se expandió rápidamente a finales de la década de los 70's fué el desarrollo de las miopatías inducidas farmacológicamente utilizando una amplia variedad de agentes químicos.

De las miopatías inducidas con fármacos en animales de experimentación, la que mejor recuerda a su análogo natural es la miotonía. En este trabajo se pretende conocer y comparar algunos parámetros bioquímicos en animales tratados con diferentes agentes miotonizantes y asociar estos cambios a la producción experimental de miotonía.

### OBJETIVOS

Para la realización de este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Inducir y mantener crónicamente un estado de miotonía experimental en animales de laboratorio mediante el uso de dos agentes farmacológicos,
- 2.- Determinar las concentraciones de hemoglobina, hematócrito, glucosa, proteínas séricas y colesterol en la sangre de estos animales, así como
- 3.- Conocer y comparar su perfil de proteínas de membranas de eritrocitos obtenidos por medio de la electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, y
- 4.- Asociar estos cambios a la producción experimental de miotonía.

## ANTECEDENTES

### I. EL SINDROME MIOTONICO

#### A. Generalidades

La miotonía es un síndrome clínico que se caracteriza por un retardo en la fase de relajación del músculo esquelético, posterior a una contracción muscular producida por un estímulo nervioso, mecánico o eléctrico (Kuhn, 1973). Brown y Harvey (1939) la describieron en términos electrofisiológicos como una tendencia anormal de la membrana muscular a descargar un tren de potenciales de acción en respuesta a una despolarización. Este fenómeno fué descrito primeramente por A.J. Thomsen (1876) como una condición hereditaria en sí mismo y en varios miembros de su familia; posteriormente, Strümpell (1881) la denominó miotonía congénita. En la actualidad se le ha relacionado con procesos distróficos en la paramiotonía congénita, miotonía distrófica y en la parálisis periódica familiar (Caughey, 1968).

El síntoma característico que se observa en un paciente miotónico consiste en una rigidez involuntaria de los músculos esqueléticos, debida a su vez a una relajación prolongada de los mismos, que se manifiesta al iniciar súbitamente alguna actividad física como caminar, correr, etc. Esta rigidez disminuye al continuar el ejercicio hasta desaparecer por completo en pocos minutos, fenómeno conocido como "calentamiento" (Ravin, 1940).

El defecto responsable de la miotonía se ha localizado en la membrana muscular, ya que el síndrome persiste aún después de aplicar curare a la placa neuromuscular, seccionar el nervio o seccionar los cordones anterolaterales de la médula espinal (Brown y Harvey, 1939; Eyzá

guirre *et al.*, 1948); de hecho, pueden producirse descargas miotónicas estimulando al músculo en cualquier región y no sólo en la región neuromuscular.

Una característica importante del músculo miotónico es la elevada resistencia eléctrica del sarcolema; particularmente, la conductancia al ión cloruro ( $G_{Cl}$ ) aparece muy reducida. Esta característica es observable en la miotonía congénita y no se presenta en los músculos sanos, por lo que se acepta que es la principal responsable del defecto miotónico (Bryant y Morales-Aguilera, 1971; Lipicky *et al.*, 1971).

Para comprender la relación entre la  $G_{Cl}$  y la actividad repetitiva en este desorden, se debe recordar la organización estructural de una fibra de músculo esquelético de mamífero. Los potenciales de acción que se propagan por la superficie de una fibra muscular; invaden a los elementos cilíndricos delgados del sistema tubular transversal (sistema T). Este sistema T está funcional y estructuralmente relacionado al sarcolema, pero su geometría presenta problemas especiales. Aunque el movimiento de salida del potasio que acompaña a un potencial de acción en la superficie de la membrana es insignificante en el gran volumen del espacio extracelular, en el volumen restringido del sistema T el potasio liberado en cada potencial de acción puede aumentar su concentración intraluminal hasta en 0.4 mM por impulso. La difusión del potasio en el sistema T está limitada y varios potenciales de acción conducirán a que se acumule este ión en los túbulos T. Si el sarcolema es permeable únicamente al potasio, esto podría dar por resultado la despolarización de la membrana; sin embargo, la  $G_{Cl}$  que es del 70 al 80% de la conductancia iónica de la membrana en reposo, minimiza los efectos de cambios en la concentración de potasio en el potencial

del sarcolema. Si la  $G_{Cl}$  en el sarcolema se reduce, el potencial de membrana se vuelve sensible a la acumulación tubular de potasio. En esta situación, varios potenciales de acción conducirán a la despolarización de la membrana. Si esta ligera despolarización es mantenida, como el sistema de conductancia al sodio se recupera rápidamente de la inactivación después de un potencial de acción, otra vez se activará la corriente de sodio y podría originar la actividad característica de la miotonía (Adrian y Bryant, 1974).

Por otra parte, diversas investigaciones acerca de la  $G_{Cl}$  en el músculo esquelético señalan que el ión cloruro podría transportarse a través de la membrana muscular por canales acuosos que podrían ser proteínas integrales (Palade y Barchi, 1977a; Wallis y Koenig, 1980). Aún se desconoce si en la miotonía tales canales están obstruidos o se encuentran en menor cantidad que en el músculo normal.

#### B. Modelos Farmacológicos de Miotonía

Los efectos miotónicos pueden ser inducidos experimentalmente en animales de laboratorio por un amplia variedad de compuestos, entre los que figuran los ácidos aromáticos monocarboxílicos (AAM) (Bryant y Morales-Aguilera, 1971) y los agentes hipocolesterolemiantes (Winer et al., 1965); ejemplo de los primeros son el ácido 9-antracencarboxílico (9-AC) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y de los agentes hipocolesterolemiantes son el 20,25-diazacolesterol (20,25-D) y el clofibrato. Se examinarán con detalle los efectos inducidos por el 20,25-D y el 9-AC.

Winer et al. (1965) demostraron que el 20,25-D que se utiliza como agente hipocolesteremiante es capaz de inducir espasmos muscula-

res y un electromiograma muy similar al de pacientes miotónicos. Rüdel y Senges (1972) demostraron que animales tratados diariamente con el 20,25-D a los pocos días desarrollan el signo miotónico con una  $G_{Cl}$  sarcolemal anormalmente reducida.

Entre las características bioquímicas de los animales tratados con el 20,25-D se incluyen: reducción de los niveles del colesterol en plasma, sarcolema y membrana eritrocítica, incremento en el contenido de desmostérol, que es un precursor de la biosíntesis del colesterol, en plasma y sarcolema (Chalikian y Barchi, 1982a), alteración de las actividades enzimáticas de la ATPasa ( $Na^+ + K^+$ ), ATPasa-Ca y p-nitrofenilfosfatasa (Peter *et al.*, 1973; Chalikian y Barchi, 1980 y 1982b).

Niebrój-Dobosz *et al.* (1976) observaron que el sarcolema de animales hechos miotónicos con hipocolesterolemiantes presentaba alteraciones en la concentración de una proteína de 100,000 daltones; sin embargo, Chalikian y Barchi (1980) no encontraron tales cambios. Por otro lado, hay información de inducción de cataratas, atrofia testicular y desórdenes de los músculos liso y cardíaco, en las ratas hechas miotónicas con esta droga (Schröder y Kuhn, 1968; Peter *et al.*, 1973; Nagatomo y Peter, 1975). Por los antecedentes anteriores se ha descrito que la miotonía inducida con el 20,25-D es más semejante a la miotonía distrófica que a la miotonía congénita (Morales-Aguilera, 1987).

El modelo experimental más satisfactorio para el estudio del fenómeno miotónico lo proporcionan los AAM (Morales-Aguilera, 1987). En él, se mimetizan las condiciones propias de la miotonía congénita: el electromiograma revela una serie de potenciales de acción repetitivos que provocan una fase de relajación muscular anormalmente lenta y la resistencia del sarcolema se incrementa paralelamente a una  $G_{Cl}$  dismi-



nuda (Bryant y Morales-Aguilera, 1971).

Por otra parte, a diferencia de los agentes hipocolesterolamiantes, la miotonía inducida por los AAM puede aparecer con una sola dosis y si la administración es endovenosa el tiempo necesario para que aparezcan los signos miotónicos es menor o igual a 60 segundos (Moffett y Tang, 1968). Por las observaciones anteriores, Bryant y Morales-Aguilera (1971) y Palade y Barchi (1977b) propusieron que el modo de acción de estos fármacos es bloqueando directamente al "canal de cloro" de la membrana muscular.

La mayoría de los trabajos de inducción de miotonía con los AAM utilizan el siguiente modelo experimental: la dosis es única y administrada endovenosa o intraperitonealmente (Moffett y Tang, 1968; Villagas-Navarro et al., 1986). Con este modelo se han investigado algunos factores biofísicos de las fibras musculares tales como resistencia total de la membrana, conductancia de algunos iones, etc.; sin embargo, no se han hecho estudios sobre las características bioquímicas que lo acompañan.

Recientemente, un grupo de trabajo dirigido por Morales-Aguilera ha empleado un modelo diferente para la inducción experimental de miotonía con AAM. En el primero de una serie de trabajos (Ramos-Ramírez et al., 1983a) utilizaron al 9-AC como agente miotonizante y lo administraron a ratas Wistar por vía oral y por un tiempo de 90 días. Encontraron que las ratas macho son más sensibles a la acción de la droga que las hembras, ya que el tiempo necesario para exhibir los signos miotónicos es más corto y la duración de los efectos es mayor. Además, observaron una considerable disminución en la curva de crecimiento de los machos en relación a su grupo testigo. El mismo grupo de investi-

gadores (Ramos-Ramírez et al., 1983b) informa no haber encontrado alteraciones histológicas ni ultraestructurales en los músculos esqueléticos de las unidades experimentales.

La búsqueda de alteraciones bioquímicas que pudieran acompañar a este modelo experimental de miotonía, puso en evidencia solamente un cambio en la relación albúmina/globulina sérica debido a una disminución en los niveles de albúmina, así como una posible reducción de los niveles de potasio en sangre, pero ninguna alteración profunda o permanente comparable a las producidas con el diazacoesterol (Jiménez-Salas et al., 1984 y 1985).

### C. Bioquímica de Eritrocitos

Aunque el músculo es el principal órgano blanco en las enfermedades que cursan con miotonía, es patente la dificultad de estudiar las características bioquímicas del sarcolema dada la elevada cantidad de contaminantes citoplásmicos de la fibra muscular, principalmente membranas derivadas de organelos citoplásmicos tales como mitocondrias y retículo sarcoplásmico. La mayoría de las investigaciones bioquímicas utilizan membranas de eritrocitos, ya que constituyen una fuente de fácil obtención de membranas libres de contaminantes. La estrategia de utilizar eritrocitos en vez de músculo se fundamenta en suponer que el defecto se expresa en diversas membranas biológicas y no sólo en el sarcolema .

En 1978, Roses y Appel publicaron una revisión de los estudios que han realizado en membranas eritrocíticas de pacientes miotónicos. Utilizando "fantasmas" (membranas libres de hemoglobina) de eritrocitos de pacientes con miotonía distrofica observaron una disminución en

la fosforilación de los polipéptidos que migran en la región de 90,000 a 100,000 daltones de peso molecular en geles de SDS-poliacrilamida, entre los que se incluyen a la ATPasa ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ ) y a las proteínas del "canal de cloro", entre otros. La microscopía electrónica de barrido mostró la presencia de una elevada cantidad de estomatocitos (eritrocitos en forma de copa) en muestras de pacientes con miotonía distrófica en relación a la población testigo.

Butterfield et al. (1976) describieron que personas con distrofia muscular de tipo Duchenne (DMD), miotonía distrófica (MD) y miotonía congénita (MC) tienen mayor fluidez en sus membranas eritrocíticas. En 1977, Butterfield y Watson encontraron resultados similares en ratas tratadas con el 20,25-diazacolesterol.

Posteriormente, Atkinson et al. (1980) estudiaron la composición de los eritrocitos de cabras miotónicas, un modelo animal de miotonía hereditaria, encontrando niveles elevados de calcio y de ácido siálico unidos a la membrana y mayor fragilidad osmótica.

## II. ELECTROFORESIS EN GELES DE PLACA DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis en gel ya ha sido utilizada en la investigación de las características bioquímicas de membranas de eritrocitos en las diversas enfermedades que cursan con miotonía. Roses et al., en 1975 describieron que el perfil electroforético de las proteínas de membranas eritrocíticas de pacientes con DMD, MD y MC no cambia grandemente comparado con los testigos normales. En cambio, en las membranas eritrocíticas de cabras miotónicas disminuye considerablemente un componente que migra en la región de 140,000 de peso molecular, por lo que se sugiere que hay un defecto generalizado en las membranas biológicas en la miotonía hereditaria (Atkinson et al., 1980).

### III. HIPOTESIS DE TRABAJO

En este trabajo se proponen dos hipótesis:

1.- Como la miotonía se relaciona con alteraciones funcionales del "canal de cloro" del sarcolema del músculo esquelético y dicho canal probablemente es de naturaleza proteica, y ya que se ha propuesto que este síndrome se presenta como un defecto que ocurre en diversas membranas celulares, se propone que: "Si en la miotonía inducida con agentes químicos también ocurre un defecto en diversas membranas celulares, probablemente se presenten alteraciones en el perfil electroforético de proteínas de membranas de eritrocitos en animales miotonizados farmacológicamente".

2.- Ya que se ha observado que en la miotonía inducida con el 20, 25-D ocurren alteraciones multisistémicas y en la miotonía inducida con el 9-AC no se presentan cambios profundos o permanentes en los animales afectados, se propone que: "En la miotonía inducida con el 20, 25-D ocurren mayores alteraciones de los componentes sanguíneos que en la inducida con el 9-AC ya que se induce un estado patológico más severo".

Este trabajo se dividió en tres partes:

- a) Se utilizaron algunos agentes farmacológicos para crear y mantener crónicamente un estado miotónico en animales de laboratorio, posteriormente
- b) Se sacrificaron y se les extrajo sangre para determinar los niveles de hemoglobina, hematócrito, glucosa, proteínas séricas totales y colesterol, finalmente
- c) Se determinó el perfil electroforético de las proteínas de membranas de eritrocitos de cada una de las unidades experimentales.

## M A T E R I A L E S

### I. ORIGEN DE LOS REACTIVOS

- 1.- De Aldrich Chemical Company.- Acido 9-antracencarboxílico (9-AC).
- 2.- De BioRad.- Azul de bromofenol y azul brillante de coomassie R-250.
- 3.- De Cooper Biomedical Inc.- Suero control Q-PAK.
- 4.- Del Instituto Mexicano del Seguro Social.- Reactivo de Biuret.
- 5.- De Laboratorios Pisa.- Solución de cloruro de sodio al 0.9%.
- 6.- De Merck.- Acido acético, ácido sulfúrico, anhídrido acético, carbonato de sodio anhidro, glicerol y metanol.
- 7.- De Ortho Diagnostics Systems.- Acuglobin (cianometahemoglobina).
- 8.- De Pro Lab.- Solución Drabkin.
- 9.- De Química Scott, S.A.- Tartrato de potasio y sodio.
- 10.- De Riker, S.A.- Lipohepin (heparina).
- 11.- De Searle Chemical Inc.- 20,25-diazacolesterol 2.HCl (20,25-D).
- 12.- De Sigma Chemical Company.- Acrilamida, bis-acrilamida (N,N-metil en-bis-acrilamida), dodecil sulfato de sodio (SDS), glicina, 2-mercaptoetanol, ortotoluidina, persulfato de amonio, propilenglicol, reactivo de folin-fenol ciocalteau, seroalbúmina bovina fracción V, TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina), tiourea y trizma base (Tris (hidroximetil) aminometano).
- 13.- De Smith Kline-French, S.A.- Anestosal (pentobarbital de sodio).
- 14.- De Técnica Química, S.A.- Glucosa, hidróxido de sodio y sulfato de cobre pentahidratado.

## II. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron ratas (Rattus norvegicus) macho Sprague-Dawley de cuarenta días de nacidas y un peso promedio de  $141.98 \pm 16.22$  g (media  $\pm$  desviación estándar) obtenidas del bioterio de la Unidad de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS. Se alimentaron ad libitum con alimento Purina y se les permitió beber agua potable libremente.

## III. EQUIPO

- 1.- Balanza analítica Chyo Júpiter modelo C<sub>3</sub>-200.
- 2.- Balanza granataria Triple Beam modelo 700.
- 3.- Cámara de electroforesis, modelo ideado por Studier (1953).
- 4.- Centrífuga Sorval modelo GLC-1.
- 5.- Centrífuga refrigerada Damon, IEC modelo B-20A.
- 6.- Densitómetro Beckman modelo R-110.
- 7.- Desionizador de agua Synbron, Barstead.
- 8.- Equipo fotográfico Reprovit Leitz modelo IIa.
- 9.- Espectrofotómetro Carl Zeiss modelo PMQ III.
- 10.- Espectrofotómetro Coleman Jr II modelo 6/35.
- 11.- Fuente de poder Camag.
- 12.- Homogeneizador Potter Elvehjem de 3 ml de capacidad.
- 13.- Microcentrifuga Solbat modelo H-07.
- 14.- Película fotográfica Kodak papel Kodalith ortho tipo 3.
- 15.- Placa de calentamiento Fisher Thermix modelo 118.
- 16.- Potenciómetro Beckman modelo Century SS-1.
- 17.- Congelador Revco de -70°C.
- 18.- Rotor Damon/IEC modelo 7/76.

- 19.- Tubos de policarbonato Nalgene de 50 ml de capacidad.
- 20.- Agitador eléctrico Thermolyne modelo M-16715.
- 21.- Equipo para disección.
- 22.- Vidrierie común de laboratorio.

## M E T O D O S

### I. PREPARACIONES EXPERIMENTALES

#### A. Preparación de las Soluciones

El agua que se utilizó en la elaboración de cualquier solución empleada en este trabajo fué previamente desionizada y almacenada a temperatura ambiente en botellas de 20 litros.

Las siguientes soluciones se prepararon el mismo día que se utilizaron:

- Solución de 9-AC a 32 mg/ml.- Se pesaron 32 mg del 9-AC y se colocaron en un tubo de ensaye al que se le agregó un ml de propilenglicol y se expuso a la flama de un mechero bunsen por 20 segundos. Inmediatamente después, se cubrió totalmente el tubo de ensaye con papel aluminio para evitar que la solución se expusiera a la luz por tiempo prolongado.

- Solución de 20,25-D a 100 mg/ml.- Se pesaron 100 mg del 20,25-D y se disolvieron en un ml de agua.

#### B. Inducción Farmacológica de Miotonía.

El diagrama general del diseño experimental utilizado se muestra en la Figura 1. Los animales de experimentación se dividieron en tres grupos de cinco animales cada uno. Al primer grupo se le administró diariamente y por vía oral el 9-AC a dosis de 32 mg/kg de peso mediante una cánula esofágica, el volumen máximo administrado fué de 0.27 ml por rata al finalizar el experimento; a otro grupo se le administró de



igual forma el 20,25-D a dosis de 50 mg/kg y un tercer grupo recibió únicamente propilenglicol (volumen máximo de 0.32 ml) y se mantuvo en las mismas condiciones que los grupos anteriores, fué el grupo testigo.

A los cuarenta días de iniciado el experimento, los animales se sacrificaron previo ayuno de 16 horas, se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital de sodio (50 mg/kg) y se extrajo sangre por punción cardíaca utilizando jeringas sin y con una o dos gotas de heparina. A este material biológico se le analizaron las variables hematológicas y bioquímicas que se describen a continuación.

## II. PRUEBAS HEMATOLÓGICAS

De la sangre obtenida con jeringas heparinizadas se tomaron dos ml y se realizaron las siguientes pruebas hematológicas:

A. Hemoglobina, por el método de la cianometahemoglobina (Hainline, 1958).

a) Preparación de los reactivos.

- Solución Drabkin.- El polvo comercial se disolvió en un litro de agua.

- Acuglobin.- Se utilizó la preparación comercial a diferentes concentraciones diluida en la solución Drabkin.

b) Método.

Las muestras se trabajaron por duplicado. Se colocaron cinco ml de la solución Drabkin en tubos de ensaye de 16 x 150 mm, se agregaron 0.02 ml de la muestra problema, se incubaron a temperatura ambiente por cinco min y la densidad óptica de las muestras se determinó espectrofotométricamente a 540 nm. Se utilizaron estándares con el acuglo-

bin diluida en la solución Drabkin entre los límites de 0 a 9 g/dl de cianometahemoglobina.

B. Hematócrito, por el método del microhematocrito (Lynch *et al.*, 1972).

a) Método.

Las muestras de sangre heparinizada se colectaron en tubos capilares de 75 mm de largo y 1.1 mm de diámetro interno, un extremo de los tubos se selló con plastilina y se centrifugaron a 11,000 rpm por cinco min. Finalmente, se midió con una regla milimétrica y se determinó el porcentaje del volumen del paquete celular.

### III. PRUEBAS BIOQUIMICAS

Las muestras de sangre extraídas con jeringas no heparinizadas se transfirieron a tubos de ensaye de 13 x 100 mm y se dejaron a temperatura ambiente por cinco min aproximadamente, se centrifugaron a 2,500 rpm y los sueros se extrajeron con pipetas Pasteur. Las muestras obtenidas se almacenaron a -70°C hasta su análisis correspondiente. Se determinaron por duplicado para cada muestra los siguientes componentes.

A. Glucosa, por el método de Dubowsky (1962).

a) Preparación de las soluciones.

- Solución de ortotoluidina.- 1.5 g de tiourea se disolvieron en 940 ml de ácido acético y se agregaron 60 ml de ortotoluidina concentrada. La solución se almacenó en un frasco oscuro a temperatura ambiente por un tiempo mínimo de 24 horas antes de utilizarse.

- Solución de glucosa.- De una solución acuosa de glucosa (10 mg/ml), se prepararon diferentes estándares entre límites de 0 a 200 mg/dl.

- Suero Control I Q-PAK.- el vial comercial se reconstituyó con cinco ml de agua.

b) Método.

Se colocaron alícuotas de 2.5 ml de la solución de ortotoluidina en tubos de 16 x 150 mm, se agregaron 0.05 ml del material biológico y se taparon con canicas; las muestras se colocaron en baño maría a ebullición por 10 min y después a un baño con hielo picado por cuatro min. Finalmente, se determinó la densidad óptica de cada una de las muestras espectrofotométricamente a 630 nm de longitud de onda.

B. Proteínas séricas totales, por el método de Biuret modificado (Reinhold, 1953).

a) Preparación de los reactivos.

- Reactivo A.- Solución de Biuret comercial.
- Reactivo B.- Solución de cloruro de sodio al 0.9% comercial.
- Suero control I Q-PAK.- El vial comercial se reconstituyó con cinco ml de agua.

b) Método.

Se colocaron 0.05 ml de las muestras en tubos de ensaye de 13 x 100 mm, se les agregaron 0.45 ml del reactivo B y dos ml del reactivo A; se incubaron 30 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia de las muestras a 540 nm de longitud de onda.

C. Colesterol total, por el método de Zlatkis et al. modificado (1953).

a) Preparación de los reactivos.

- Reactivo A.- Se mezclaron cuidadosamente 200 ml de ácido acético y 300 ml de anhídrido acético.
- Reactivo B.- ácido sulfúrico concentrado comercial.
- Suero control I Q-PAK.- el vial comercial se reconstituyó con cinco ml de agua.

b) Método.

Se colocaron alícuotas de cinco ml del reactivo A en tubos de 13 x 100 mm, se agregaron porciones de 0.05 ml del reactivo B a cada tubo y se incubaron a 4°C por cinco min, se agregaron 0.1 ml de las muestras biológicas y se agitaron inmediatamente con un agitador eléctrico, se almacenaron en oscuridad por 15 min y las densidades ópticas de las muestras se determinaron a 630 nm.

IV. ELECTROFORESIS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA DE PROTEINAS DE MEMBRANAS ERITROCITICAS

Esta parte del trabajo se dividió en tres secciones que se describen a continuación:

A. Aislamiento de las membranas eritrocíticas

La metodología empleada se basó en la descrita por Tanner y Boxer en 1972.

a) Preparación de los reactivos.

- Reactivo A.- Solución comercial de cloruro de sodio al 0.9% y pH de 7.0.

- Reactivo B.- Se tomaron 233 ml del reactivo A y se aforaron a un litro con agua.

b) Método

Las muestras de sangre con anticoagulante se centrifugaron a 2,500 rpm y se obtuvieron los paquetes celulares extrayendo con pipetas Pasteur el plasma y la capa amarillenta de glóbulos blancos. El paquete celular de cada una de las muestras se lavó tres veces con el reactivo A a 4°C, se tomaron dos ml de este paquete y se pasaron a tubos de centrifuga que contenían 28 ml del reactivo B, se centrifugaron a 20,000 g a 4°C por una hora, se extrajo el sobrenadante y el precipitado obtenido se lavó de dos a tres veces con el reactivo B hasta obtener un precipitado cremoso que al observarse al microscopio de contraste de fases mostró membranas de eritrocitos libres de hemoglobina ("fantasmas"). El precipitado cremoso se resuspendió en el reactivo A, se homogeneizó con un homogeneizador manual y se almacenó a -70°C hasta su siguiente análisis.

B. Proteínas totales

Se utilizó el método descrito por Lowry et al. en 1951.

a) Preparación de los reactivos.

- Reactivo A.- Se pesaron dos g de hidróxido de sodio, 10 g de carbonato de sodio y 0.1 g de tartrato de potasio y sodio que se disolvieron y aforaron en 50 ml de agua.

- Reactivo B.- 0.5 g de sulfato de cobre pentahidratado se disolvieron y aforaron en 100 ml de agua.

- Reactivo C.- Se mezclaron 10 ml del reactivo A y 0.2 ml del reactivo B.

- Reactivo D.- Se mezclaron 20 ml del reactivo de folin-fenol ciocalteau y 20 ml de agua que se almacenaron en frasco oscuro.

b) Método

En tubos de ensaye de 13 x 100 mm se colocaron 75  $\mu$ l del material biológico (membranas de eritrocitos libres de hemoglobina), se agregaron 750  $\mu$ l del reactivo C y se mezclaron inmediatamente con un agitador eléctrico, se incubaron 10 min a temperatura ambiente, se agregaron 75  $\mu$ l del reactivo D, se volvieron a agitar y se incubaron nuevamente por 30 min a temperatura ambiente; las densidades ópticas se leyeron a 750 nm de longitud de onda. Las determinaciones se hicieron por triplicado de cada una de las muestras y los estándares de seroalbúmina (fracción V) se utilizaron entre los límites de 0 a 75  $\mu$ g.

C. Electroforesis en geles de placa.

La electroforesis en geles de dodecil sulfato de sodio (SDS)-poliacrilamida discontinuo al 5-8% se realizó según el método de Laemmli (1970).

a) Preparación de las soluciones.

- Solución A.- 30 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida se disolvieron y aforaron a 100 ml de agua; la solución se filtró (papel filtro Ederol No 2) y se almacenó en frasco oscuro a 4°C hasta su uso.

- Solución B.- Se pesaron 20 g de dodecil sulfato de sodio y se disolvieron en 100 ml de agua.

-Solución C.- Se mezclaron 18.165 g de trizma base, dos ml de solución B y se aforaron a 100 ml con agua ajustando previamente el pH a 8.8.

- Solución D.- Se mezclaron 6.055 g de trizma base, dos ml de la solución B y se aforaron a 100 ml con agua ajustando previamente el pH a 6.8.
- Solución E.- 0.125 g de persulfato de amonio se disolvieron en un ml de agua. La solución se preparó el mismo día que se utilizó.
- Solución F.- TEMED comercial.
- Solución G.- Se mezclaron 28.82 g de glicina, 6.04 g de trizma base y un ml de la solución B, se disolvieron y aforaron a 2,000 ml de agua.
- Solución H.- Se mezclaron 0.45 g de trizma base, 1.2 g de SDS, seis ml de glicerol, 0.06 g de azul de bromofenol, tres ml de 2-mercaptoetanol y 21 ml de agua.
- Solución I.- Se mezclaron 400 ml de etanol, 100 ml de ácido acético y 500 ml de agua.
- Solución J.- Se pesaron 0.25 g de azul brillante de coomassie R-250 y se disolvieron en 100 ml de la solución H.

b) Breve descripción del aparato.

La electroforesis se realizó en geles de placa, en un aparato descrito por Studier en 1973 y que se ilustra en la Figura 2. Se utilizaron geles de un mm de grosor, siendo la longitud del gel separador de 16 cms y del gel espaciador de 0.5 cms.

c) Método.

El gel separador se preparó mezclando ocho ml de la solución A, 7.5 ml de la C y 14 ml de agua. Después se agregaron 300  $\mu$ l de la solución E y 22.5  $\mu$ l de la F; la mezcla se colocó inmediatamente entre las placas de vidrio preparadas como se muestra en la Figura 2c y 2d, la mezcla se cubrió inmediatamente con agua y se le permitió polimeri-

zar. Después de la polimerización, la capa de agua se removió y el gel espaciador se preparó mezclando los siguientes volúmenes de las mismas soluciones madre (excepto la solución C que se cambió por la solución D) 0.83 ml, 1.25 ml y 2.91 ml, respectivamente; así como 50  $\mu$ l de la solución E y cinco  $\mu$ l de la F. Posteriormente, se colocó el peine de polipropileno y se dejó que el gel polimerizara por 30 min antes de quitarlo; finalmente, se dejó toda la noche a temperatura ambiente para su total polimerización.

Las muestras de membranas de eritrocitos se colocaron en tubos Eppendorf y se agregaron volúmenes iguales de la solución H, se calentaron en baño maría a ebullición por dos min y se dejaron enfriar. Se colocaron 30  $\mu$ g de las muestras en cada celda del gel; la electroforesis se efectuó en el aparato que se describe en la Figura 2b (usando la solución G como amortiguador de cámara) a 70 volts por ocho horas; los gels fueron fijados en la solución I toda la noche, se tiñeron con la solución J por 45 min en agitación continua y finalmente se pasaron por varios cambios de la misma solución hasta que el fondo del gel perdiera el color y las bandas de proteínas permanecieran azules. Finalmente, los gels fueron fotografiados y de las filminas se obtuvieron los registros densitométricos a 520 nm de longitud de onda y a una abertura de 0.2 mm.

La nomenclatura de las bandas del electroforetograma que se muestra en la Figura 3 corresponde a la utilizada por otros autores para proteínas de membranas de eritrocitos de humano (Goodman y Shiffer, 1983; Sherman, 1985); Se utilizó este patrón como referencia para la nomenclatura y el peso molecular de los polipéptidos principales dada la similitud entre las bandas electroforéticas más importantes de muestras de ratas y de humanos.



## V. ANALISIS ESTADISTICO

Ya que las características del diseño experimental (pequeño número de observaciones y varianza y distribución muestral desconocidas) se ajustaron mejor a un análisis estadístico no paramétrico, se utilizó el método de análisis de varianza de Kruskal-Wallis y el método de comparación de rangos de Newman-Keulls (Zar, 1974a y 1974b, respectivamente) para comparar los resultados obtenidos en las determinaciones hematológicas y bioquímicas de los animales expuestos a los diferentes tratamientos.

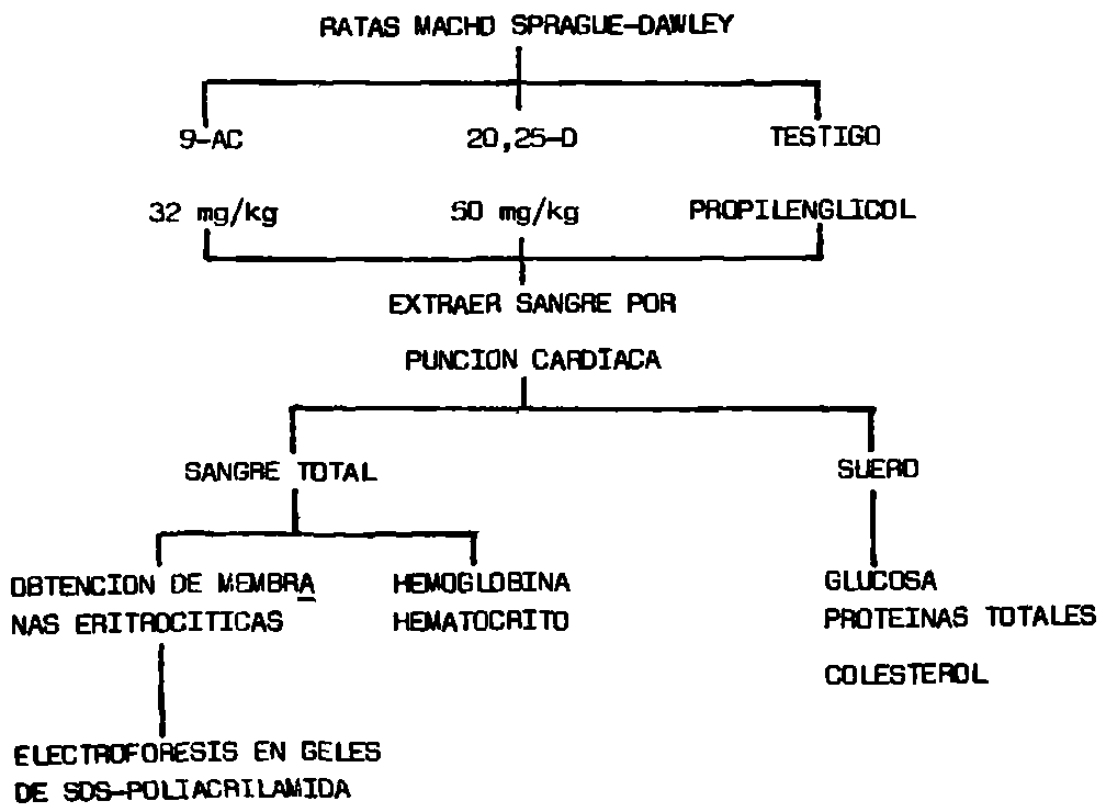


Figura 1. Diagrama general de flujo de los procedimientos empleados.

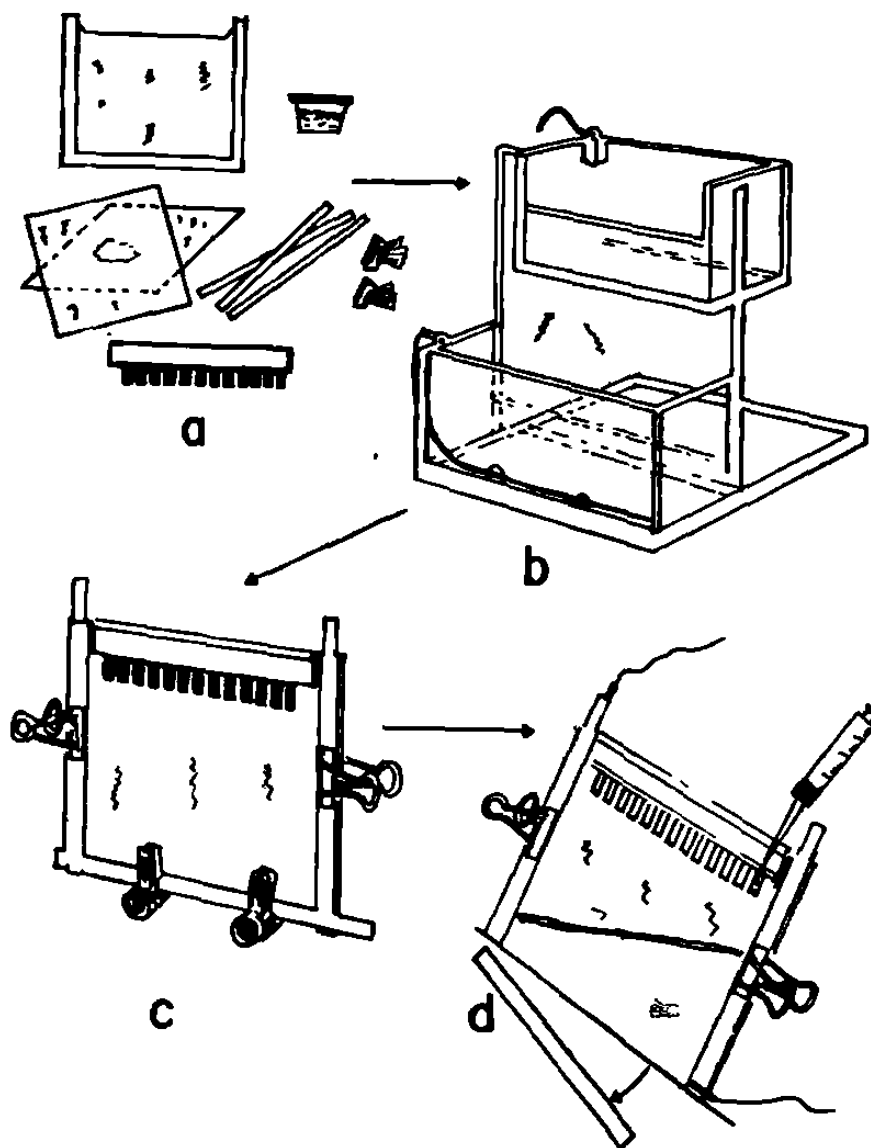


Figura 2. Equipo utilizado para realizar la electroforesis.  
 a) placas de vidrio, sujetadores de aluminio, separadores y peine de polipropileno; b) cámara de acrílico para electroforesis; c) placas de vidrio ensambladas listas para ser llenadas; d) forma de introducir la solución de acrilamida entre las placas de vidrio.

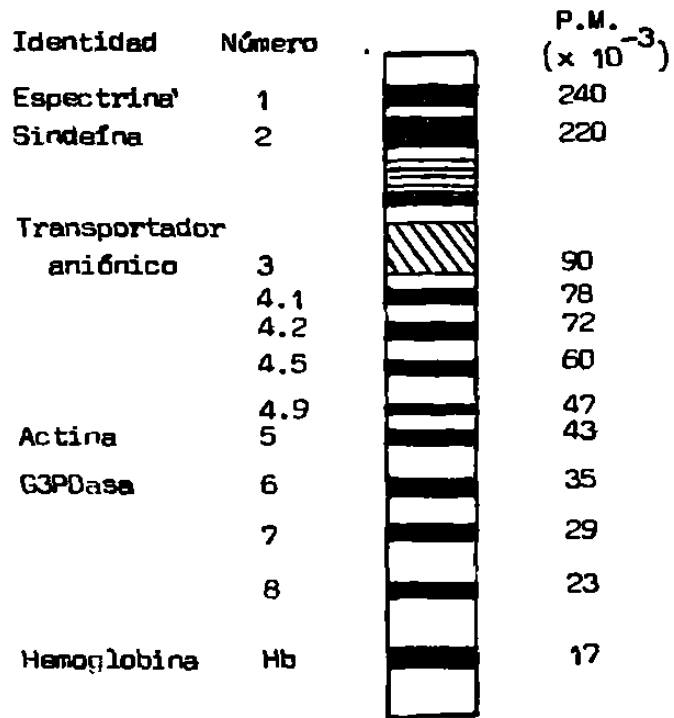


Figura 3. Representación esquemática de las principales proteínas de la membrana de eritrocitos humanos separadas por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. El patrón de bandeo se muestra después de la tinción con azul de coomassie. Esquema basado en Sherman (1985).

## RESULTADOS

Los animales de experimentación se trataron diariamente con diversos agentes miotonizantes. A los cuarenta días de comenzado el experimento, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de sangre que se utilizaron para realizar algunas determinaciones hematólogicas y bioquímicas. Los resultados se muestran a continuación:

En el Cuadro I se muestran los resultados de las variables hematólogicas y bioquímicas que se estudiaron; los valores se expresan como la media aritmética  $\pm$  la desviación estándar y fueron cinco las observaciones utilizadas para calcular cada promedio. Los valores de cada una de las determinaciones efectuadas aparecen en las Figuras 5 a la 9 y los resultados del análisis de varianza empleado se indican en el Cuadro II.

### I. DESCRIPCION DE LOS ANIMALES AFECTADOS

Los síntomas clínicos de miotonía se hicieron obvios el mismo día que comenzó el tratamiento con el 9-AC. Los animales se mostraron reacios a moverse y su locomoción fué lenta y torpe, durando el efecto algunas veces hasta 24 horas después de la administración de la droga. La postura de los animales fué inducida por la contractura de los músculos esqueléticos como se muestra en la Figura 4. Las ratas que recibieron este tratamiento finalizaron con un peso de  $275.5 \pm 15.85$  g (media  $\pm$  desviación estándar), mientras que el grupo testigo terminó con un peso de  $323.8 \pm 31.06$  g.

Las ratas tratadas con el 20,25-D mostraron signos de rigidez muscular hasta los 30 días después de iniciado el experimento y fué de menor grado que el de los animales que recibieron el 9-AC. Aunque algunos animales mostraron señales de diarrea, terminaron con un peso de  $309.2 \pm 25.07$  g que fué muy similar al peso del grupo testigo.

## II. PRUEBAS HEMATOLÓGICAS

### A. Hemoglobina

En la Figura 5 se presentan los valores de hemoglobina encontrados en los animales expuestos a los diferentes tratamientos. En el grupo testigo se observó la mayor dispersión con límites de 13.5 a 17.0 g/dl ( $\bar{x} = 15.48$  g/dl); en los animales mionizados con 9-AC la dispersión fué menor siendo el límite inferior de 13.9 y el límite superior de 15.3 g/dl ( $\bar{x} = 13.96$  g/dl) y no fueron diferentes estadísticamente del grupo testigo; por último, se encontró una marcada disminución de esta proteína en los animales tratados con el 20,25-D ya que sus valores estuvieron entre 11.5 y 12.6 g/dl ( $\bar{x} = 12.08$  g/dl) siendo estadísticamente diferentes del grupo testigo y del grupo tratado con el 9-AC.

### B. Hematócrito

El porcentaje de células rojas en sangre de cada una de las ratas que recibieron los diferentes tratamientos se muestra en la Figura 6. Los niveles de hematócrito del grupo testigo estuvieron entre 45 y 50% ( $\bar{x} = 47.6\%$ ) con una dispersión muy similar a la de los otros grupos; el porcentaje del paquete celular de los animales que recibieron el 9-AC fluctuó entre 41 y 45% ( $\bar{x} = 43.2\%$ ) y el de las ratas tratadas con el

20,25-D entre 40 y 44% ( $\bar{x} = 41,8\%$ ) siendo ambos diferentes al grupo testigo y similares entre sí.

### III. PRUEBAS BIOQUIMICAS

#### A. Glucosa

Los valores de los niveles séricos de glucosa encontrados en las unidades experimentales se indican en la Figura 7. La glucosa sanguínea del grupo testigo mostró una mínima dispersión estando sus límites entre 155.03 y 160.13 mg/dl ( $\bar{x} = 157,56$  mg/dl); contrario a esto, los valores de glicemia de los grupos de animales mionizados mostraron dispersiones muy amplias, estando entre 83.54 y 172.30 mg/dl ( $\bar{x} = 117,83$  mg/dl) en los animales tratados con 9-AC y entre 80.54 y 160.26 mg/dl ( $\bar{x} = 122,56$  mg/dl) en los animales que recibieron el 20,25-D. Lo anterior ocasionó que no fuera posible encontrar diferencias significativas con el análisis estadístico empleado; sin embargo, es evidente que las distribuciones de los niveles séricos de glucosa en los animales mionizados son diferentes a la del grupo testigo.

#### B. Proteínas séricas totales

En la Figura 8 se presentan los niveles séricos de proteínas totales encontrados en cada uno de los animales sometidos a los diferentes tratamientos. En el grupo testigo se encontraron niveles proteicos que van desde 5.16 hasta 6.12 g/dl ( $\bar{x} = 5,57$  g/dl) y una mayor dispersión que en los valores observados en los grupos de animales mionizados cuyos niveles variaron entre 5.27 y 5.83 g/dl ( $\bar{x} = 5,47$  g/dl) en las tratadas con el 9-AC y 5.59 y 6.12 g/dl ( $\bar{x} = 5,91$  g/dl) en los que

recibieron el 20,25-D. Aún así, estas variaciones no fueron estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos.

### C. Colesterol

La concentración de colesterol en el suero de cada uno de los animales expuestos a los diferentes tratamientos se muestra en la Figura 9. En los animales del grupo testigo se observó una amplia dispersión en los valores de los niveles séricos de este lípido y estuvieron entre 62.94 y 78.08 mg/dl ( $\bar{x} = 71.26$  mg/dl); un comportamiento muy similar se observó en los niveles colesterolemiantes del grupo que recibió el 9-AC cuyos valores oscilaron entre 65.47 y 84.32 mg/dl ( $\bar{x} = 74.04$  (mg/dl) y fueron estadísticamente similares al grupo testigo. Finalmente, el grupo tratado con el 20,25-D tuvo bajos niveles y poca dispersión en sus resultados y éstos fluctuaron entre 40.24 y 46.22 mg/dl ( $\bar{x} = 45.02$  mg/dl), esta marcada reducción de los niveles séricos de colesterol fué estadísticamente diferente al comparar estos valores con los del grupo testigo y los de animales que recibieron el 9-AC.

## IV. ELECTROFORISIS EN GELES PLANOS

En la Figura 10 se muestran los electroforetogramas típicos de las proteínas de membranas eritrocíticas de los animales sometidos a los diferentes tratamientos, así como el diagrama esquemático de cada uno de los carriles. De igual modo, en la Figura 11 aparecen los perfiles densitométricos de los electroforetogramas mostrados en la figura anterior. Con una flecha se indican las alteraciones en los principales picos del patrón densitométrico de la muestra de animales tratados con el 9-AC y consiste en disminuciones en los polipéptidos que migran en



las regiones de peso molecular de 26,000 y 29,000 daltones e incrementos en los polipéptidos que migran en las regiones de 59,000 y 135,000 daltones de peso molecular. Además, se observó un ligero incremento en una banda de menor intensidad cuyo peso molecular aparente es de 85,000 daltones. Por otro lado, el perfil densitométrico de la muestra de animales tratados con el 20,25-D no mostró diferencias evidentes al compararlo con el grupo testigo.

**Figura 4. Animal con miotonía experimental después de 30 días de tratamiento con los agentes farmacológicos. Note la postura de extensión anormal de las patas traseras.**

Cuadro I. Resultados de las determinaciones hematológicas y bioquímicas efectuadas a ratas misonizadas experimentalmente. Se muestran la media  $\pm$  la desviación estándar; el número entre paréntesis corresponde al de animales por tratamiento.

	TESTIGO (5)	9-AC (5) 32 mg/kg	20,25-D (5) 50 mg/kg
Hemoglobina (g/dl)	15.48 $\pm$ 1.45	13.96 $\pm$ 0.79	12.08 $\pm$ 0.55
Hematócrito (%)	47.60 $\pm$ 1.95	43.20 $\pm$ 1.64	41.80 $\pm$ 1.79
Glucosa (mg/dl)	157.55 $\pm$ 2.46	117.83 $\pm$ 32.90	122.56 $\pm$ 30.44
Proteínas séricas totales (g/dl)	5.57 $\pm$ 0.46	5.47 $\pm$ 0.24	5.91 $\pm$ 0.23
Colesterol (mg/dl)	71.26 $\pm$ 6.02	74.04 $\pm$ 7.03	45.02 $\pm$ 2.67

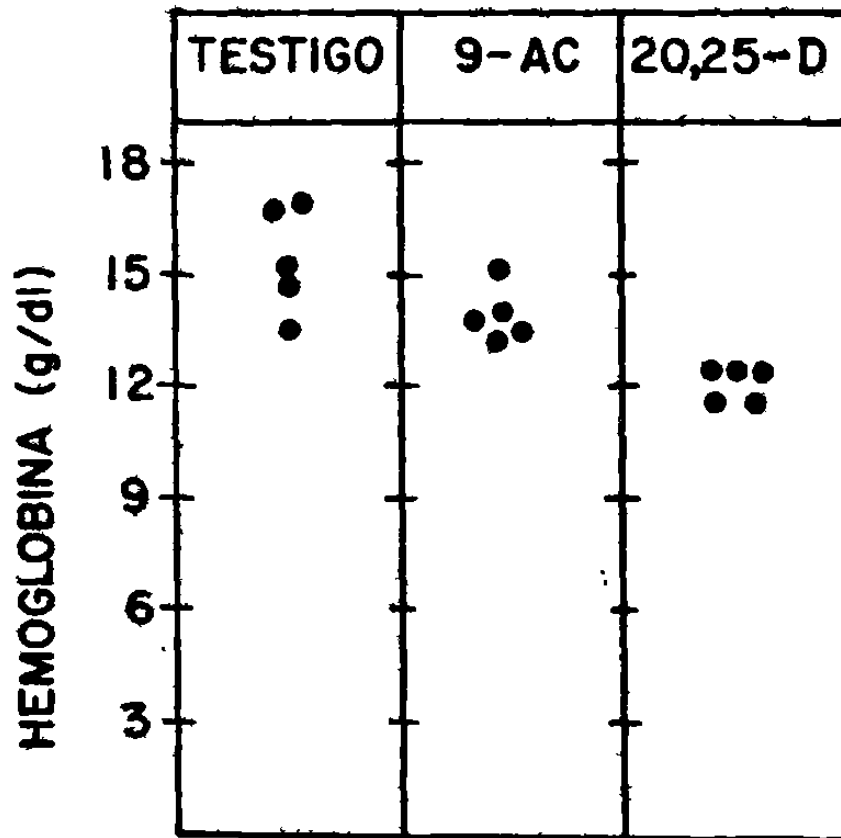


Figura 5. Niveles de Hemoglobina (g/dl) detectados en la sangre de cada una de las cinco ratas expuestas a los diferentes tratamientos.

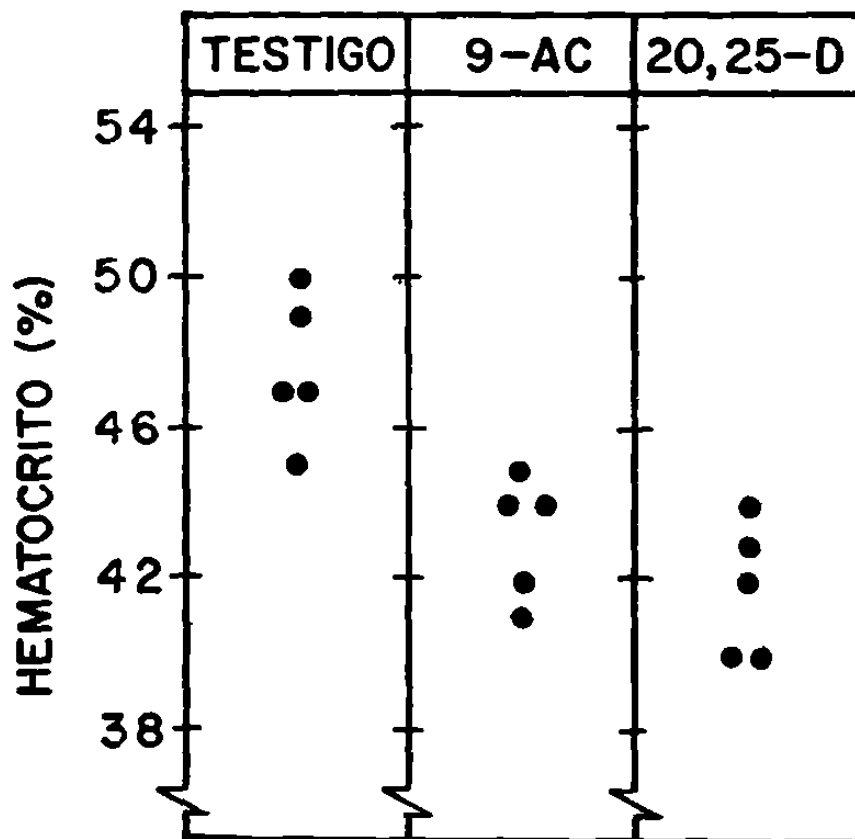


Figura 6. Valores del porcentaje del paquete celular (%) en sangre de cada una de las cinco ratas expuestas a los diferentes tratamientos.

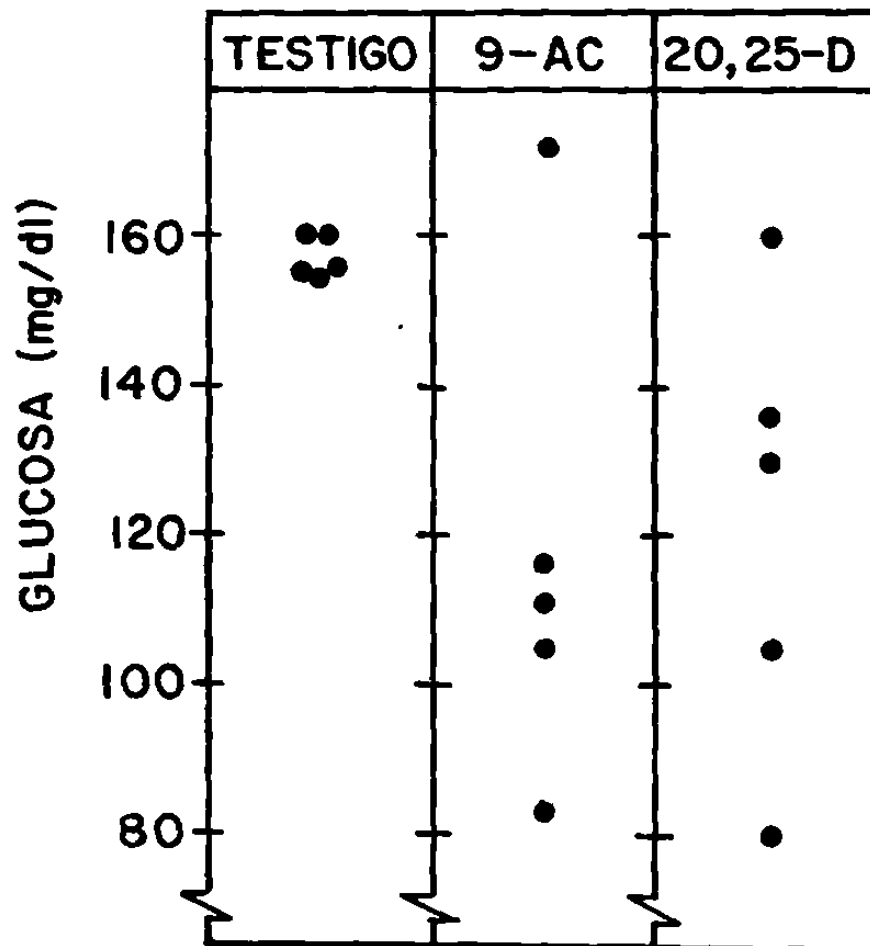


Figura 7. Valores de Glucosa (mg/dl) en el suero de cada una de las cinco ratas expuestas a los diferentes tratamientos.

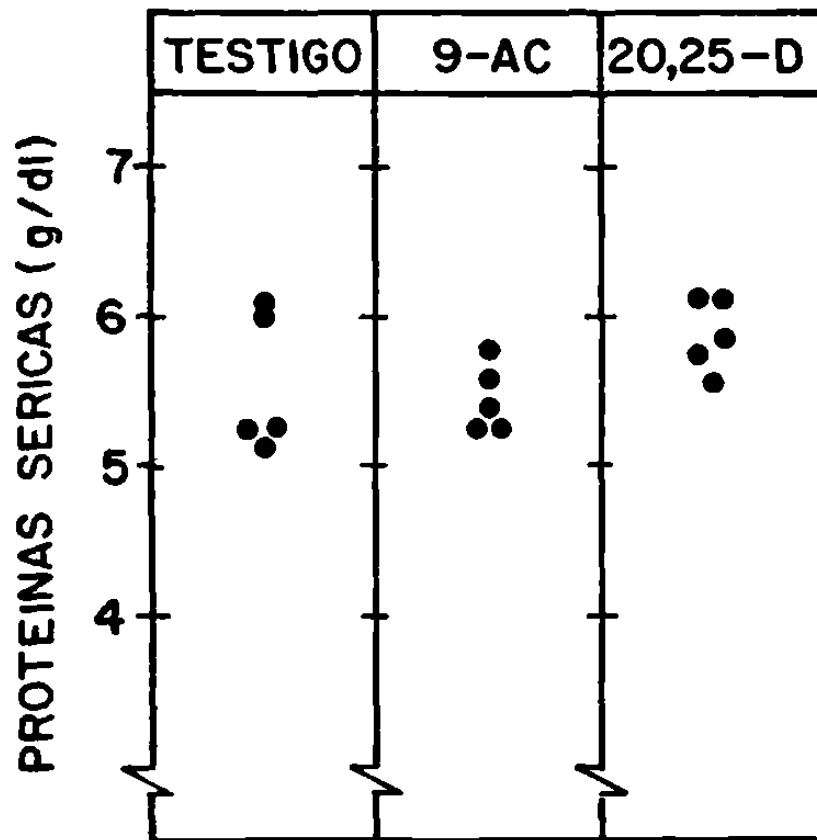


Figura 8. Niveles de Proteínas totales (g/dl) en el suero de cada una de las cinco ratas expuestas a los diferentes tratamientos.

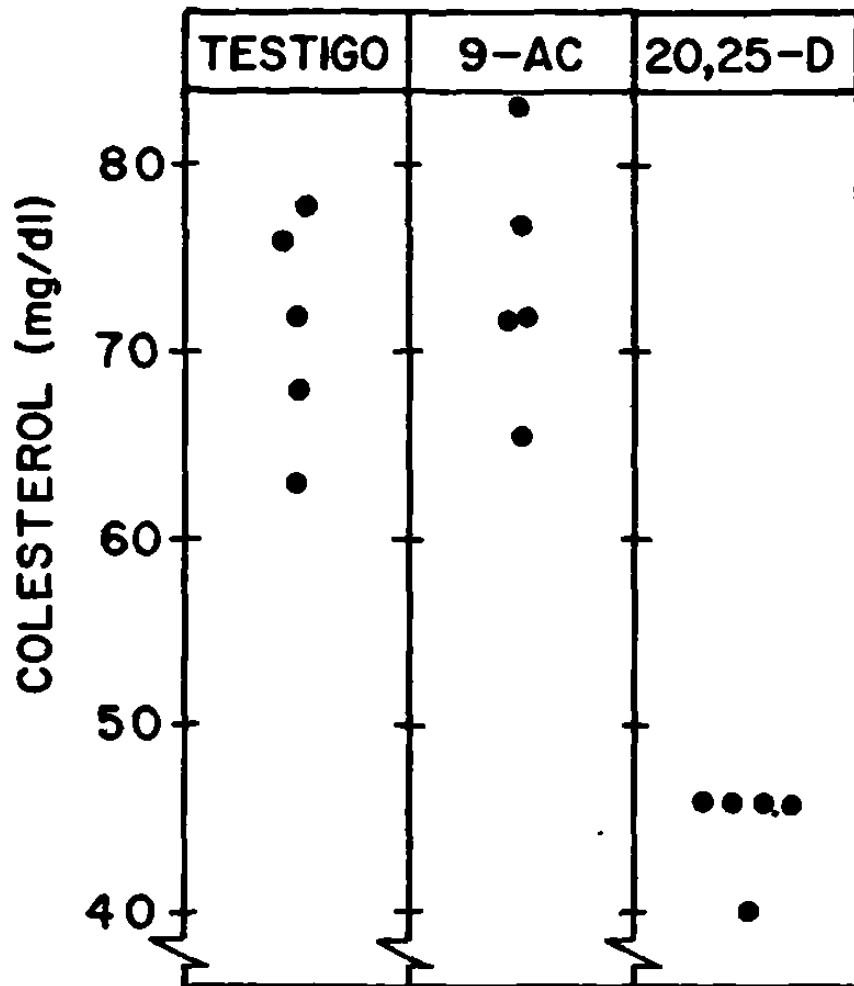


Figura 9. Niveles de Colesterol (mg/dl) en suero de cada una de las ratas expuestas a los diferentes tratamientos.



CUADRO II. Resultados del análisis de varianza aplicado a las determinaciones hematólogicas y bioquímicas realizadas a los animales mionizados experimentalmente. Se indican los valores mínimo y máximo encontrados en cada uno de los tratamientos.

PRUEBA	T E S T I G O		20,25-0	
	inferior - superior (32 mg/kg)	9 - AC (32 mg/kg)	inferior - superior (50 mg/kg)	inferior - superior (50 mg/kg)
Hemoglobina (g/dl)	13.5 - 17.0	13.9 - 15.3	11.5 - 12.6*	
Hematócrito (%)	45 - 50	41 - 45	40 - 44	
Glucosa (mg/dl)	155.03 - 160.13	83.54 - 172.30	80.54 - 150.26	
Proteínas séricas totales (g/dl)	5.16 - 6.12	5.27 - 5.83	5.59 - 6.12	
Colesterol (mg/dl)	62.94 - 78.08	65.47 - 84.38	40.24 - 46.22**	

NOTA: \* diferencia significativa con el grupo testigo ( $P < 0.05$ )  
 \*\* diferencia significativa con el grupo testigo y el otro grupo experimental ( $P < 0.05$ ).

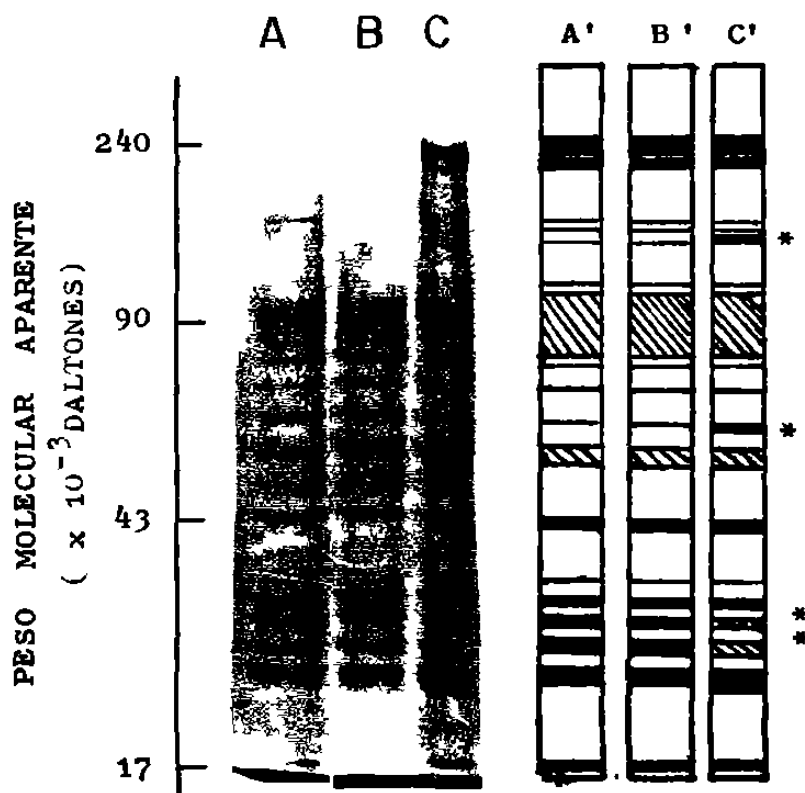


Figura 10. Electroforetogramas de proteínas de membranas eritrocíticas de ratas A) Testigo, B) Tratadas con el 20,25-D, y C) Tratadas con el 9-AC. Las alteraciones se indican con un asterisco.

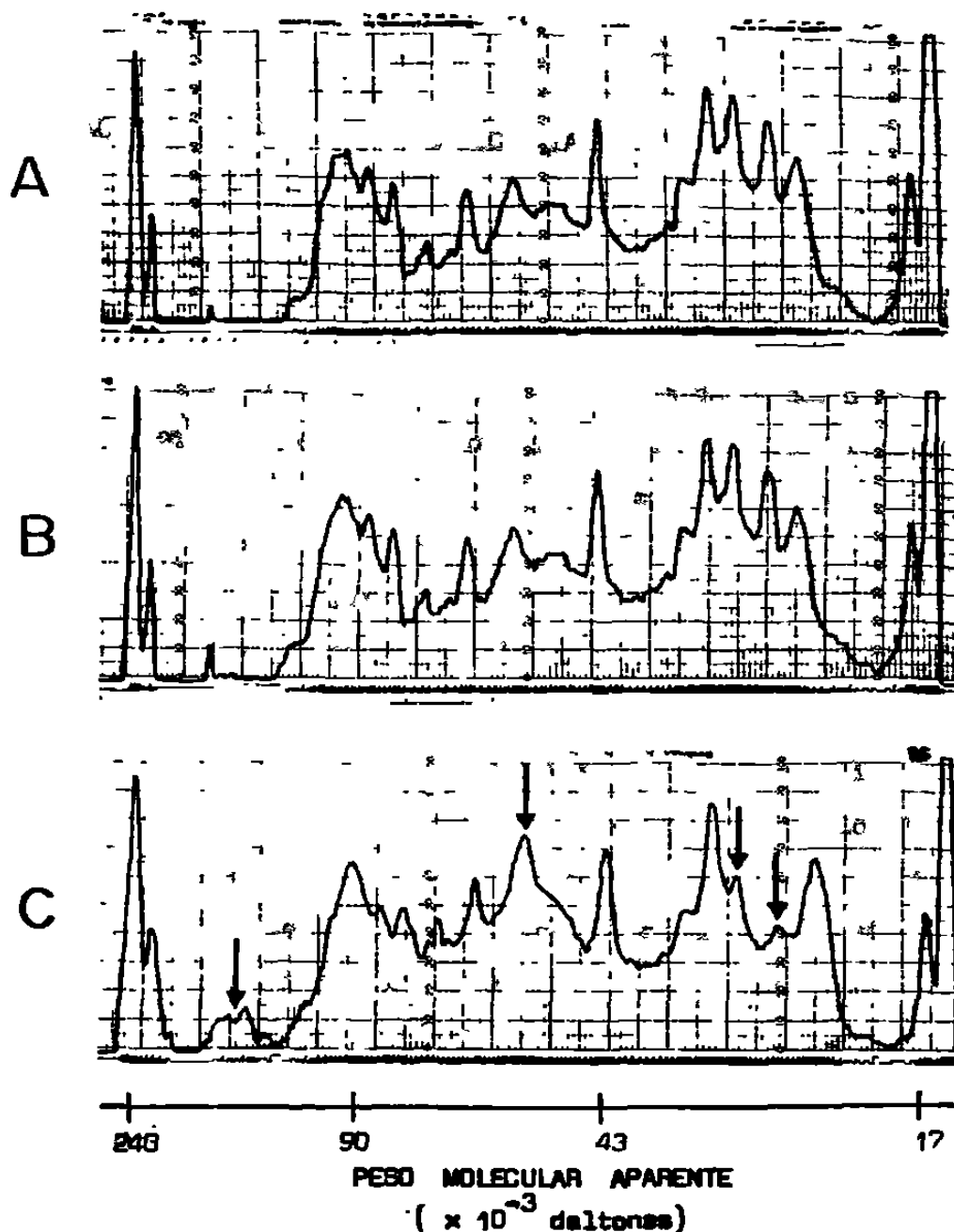


Figura 11. Perfiles densitométricos de los electroforetogramas de membranas eritrocíticas de ratas A) Testigo, B) Tratadas con el 20,25-D, y C) Tratadas con el 9-AC. Obsérvense las alteraciones en el perfil densitométrico C) que corresponden a incrementos en los picos de 59,000 y 135,000 y disminuciones en los picos de 26,000 y 29,000 daltones.

## D I S C U S I O N

### I. INDUCCION EXPERIMENTAL DE MIOTONIA

Los animales que recibieron el 9-AC mostraron miotonía clínica y disminuyeron su curva de peso en forma similar a la descrita anteriormente para ratas Wistar y Long-Evans (Ramos-Ramírez et al., 1983a; Jiménez-Salas et al., 1984) pero, a diferencia de lo que pasa en éstas, en la línea Sprague-Dawley la duración de los efectos miotónicos frecuentemente se prolongó hasta 24 horas después de la administración de la droga y la reducción final en el peso de los animales miotonizados fué mayor. Estos resultados, aunado a los que se describirán en secciones posteriores, indican que las ratas Sprague-Dawley son más sensibles a la acción del 9-AC.

Los animales tratados con el 20,25-D no mostraron signos tan evidentes de miotonía como los que recibieron el 9-AC. A los 30 días de iniciado el experimento tuvieron dificultades al caminar, así como diarrea y excreción de grandes cantidades de orina que son signos característicos de la acción de este fármaco (D'Alonzo y McArdle, 1982). La disminución de los signos miotónicos en animales deshidratados ha sido observada por otros autores en la miotonía natural (Hegyeli y Szent-Györgyi, 1961), aunque no se ha descrito el mecanismo de los efectos de la deshidratación.

Un gran problema descrito por otros autores (Peter et al., 1975; D'Alonzo y McArdle, 1982) en los animales tratados crónicamente con el 20,25-D es su susceptibilidad a infecciones pulmonares acompañada de dificultades para ganar peso; sin embargo, estos problemas no se presentaron en este estudio y los animales terminaron en aparente buena salud.

## II. PRUEBAS HEMATOLÓGICAS

Los niveles hematológicos encontrados en los animales del grupo testigo son similares a los informados anteriormente (Vondruska y Greco, 1973). Los animales miotonizados con el 9-AC tuvieron valores de hemoglobina muy similares al grupo testigo, observación comparable a la descrita en informes anteriores (Jiménez-Salas et al., 1984); sin embargo, se puso en evidencia una reducción del porcentaje de células rojas en sangre que refleja un posible estado de anemia que no había sido observado previamente (Jiménez-Salas et al., 1984). Por otra parte, la marcada reducción de los niveles de hemoglobina y del hematócrito en las ratas tratadas con el 20,25-D muestran un mayor efecto de esta droga sobre los factores hematológicos en estudio y se carece de antecedentes al respecto.

Se sabe que algunos fármacos pueden ocasionar anemia de varias maneras, a saber: 1) estimular la producción de anticuerpos que a su vez destruyan al eritrocito; 2) reaccionar en forma directa con la membrana del eritrocito normal para producir anomalías que causen hemólisis; o, 3) producir ciertas reacciones que no sean tóxicas para los eritrocitos normales pero que sí lo sean para glóbulos rojos deficientes en procesos de detoxificación. De estas tres posibilidades, no se tienen datos con agentes miotonizantes con respecto a la número 1. En relación a la segunda posibilidad, se sabe que los agentes miotonizantes originan cambios -funcionales y/o estructurales<sup>f</sup> en las membranas celulares, que posiblemente contribuyan a una destrucción más rápida del eritrocito; la tercer posibilidad se vé apoyada en los efectos ocasionados por el clofibrato, un agente hipocolesterolemiante y miotonizante

que origina grandes alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos (Wilkering et al., 1978). Por analogía con el clofibrato, posiblemente estos agentes miotonizantes alteren el metabolismo del glóbulo rojo cuya principal fuente de energía es la vía glicolítica. Es muy posible que los hematíes alterados sean secuestrados en el bazo y que la producción de glóbulos rojos no compense su mayor destrucción.

Por otra parte, el estado de anemia no es un fenómeno característico de las enfermedades que cursan con miotonía natural (Samaha et al., 1967; Atkinson et al., 1980) por lo que se sugiere que en la miotonía experimental se debe a un defecto colateral de los fármacos.

### III. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

#### A. Glucosa

La concentración de glucosa en la sangre del grupo de ratas que se utilizó como testigo fué similar a la informada anteriormente por Powanda et al. en 1976. Aunque no se observaron diferencias significativas en la glucosa sérica de los animales miotónicos comparados con el grupo testigo, sí se observó una tendencia a disminuir los niveles glicémicos de los primeros. Lo anterior apoya el concepto de que las ratas Sprague-Dawley son más sensibles a la acción del 9-AC que las ratas Long-Evans ya que en estas últimas no aparece esa tendencia (Jiménez-Salas et al., 1984). Un fenómeno similar fué observado en los animales que recibieron el 20,25-D y se carece de información previa acerca de dicha tendencia hipoglicémica.

Por otra parte, algunos antecedentes indican que el clofibrato administrado a grandes dosis altera profundamente el metabolismo de la

glucosa pues disminuye sus niveles sanguíneos (Powanda et al., 1976), disminuye el contenido de glicógeno hepático aumentando su degradación y disminuyendo su síntesis (Platt y Thorp, 1966) y disminuye los intermediarios de la vía glicolítica (Wilkening et al., 1978), entre otros efectos. Por analogía con este agente, es posible que los fármacos miotonizantes en estudio ocasionen anomalías en el hígado que afecten su capacidad de elaborar una cantidad suficiente de glucosa para contrarrestar las velocidades ordinarias de su utilización en la periferia con la consiguiente hipoglicemia y que este efecto fuera más intenso a mayores dosis.

Se ha descrito que pacientes con miotonía distrófica sufren alteraciones en el metabolismo de la glucosa tales como hiperinsulinemia (Barbosa et al., 1974), intolerancia a la glucosa (Barbosa et al., 1974) y resistencia a la insulina (Tevaarwerk y Hudwon, 1977). Por lo anterior, posiblemente la ligera hipoglicemia observada en las unidades experimentales se relacione con la miotonía experimental, aunque no se descarta un posible efecto colateral de las drogas.

## B. Proteínas séricas totales

Los niveles de proteínas séricas de los animales que se utilizaron como testigos son similares a los publicados por Powanda et al. en 1976. No se encontraron diferencias significativas entre las ratas miotonizadas y el grupo testigo, sugiriendo que el 9-AC y el 20,25-D no alteran la cantidad total de las proteínas del suero, resultados que concuerdan con los observados anteriormente en animales tratados sólo con el 9-AC (Jiménez-Salas et al., 1984). Estos resultados también concuerdan con las observaciones descritas por Lipicky et al. (1971) que informaron no

haber encontrado alteraciones en el contenido total de proteínas séricas de pacientes con miotonía congénita.

El que no haya disminución de las proteínas totales no descarta posibles alteraciones en los niveles de las fracciones proteicas pues el clofibrato tampoco cambia el contenido total de proteínas séricas y sí aumenta el contenido de albúmina y disminuye la fracción alfa 2 (Powanda et al., 1976); por su parte, el 9-AC disminuye el contenido de albúmina en el suero provocando una disminución de la relación albúmina/globulina (Jiménez-Salas et al., 1985)

### C. Colesterol

Los niveles de colesterol encontrados en el grupo testigo son muy similares a los publicados por D'Costa et al. en 1977. Además, los valores encontrados en los animales miotónicos corresponden a los descritos previamente. Los animales tratados con el 20,25-D tuvieron niveles séricos de colesterol reducidos casi la mitad de los encontrados en el grupo testigo, resultados que concuerdan con los publicados por Winer et al. en 1965 y 1966. El efecto hipocolesterolemiante del 20,25-D es bien conocido y se debe a una reducción en la biosíntesis del colesterol (Steinberg y Avigan, 1960). Los niveles encontrados en el grupo de animales que recibieron el 9-AC fueron similares a los del grupo testigo y concuerda con lo informado anteriormente (Jiménez-Salas et al., 1984).

Estos resultados indican que el 9-AC -a diferencia de los agentes hipocolesterolemiantes- no altera el metabolismo del colesterol tan evidentemente como el 20,25-D, lo que permite suponer que no origina alteraciones de los esteroides de las membranas celulares y que aparente-



mente el mecanismo de inducción del síndrome miotónico a nivel subcelular con el 9-AC es diferente al descrito para el 20,25-D.

Ya que no hay alteraciones en el contenido del colesterol plasmático y sarcolemal de pacientes con miotonía distrófica y miotonía congénita ni en cabras con miotonía hereditaria (Rüdel y Lehmann-Horn, 1985), es evidente que la miotonía por 20,25-D es marcadamente diferente de las miotonías hereditarias y de la inducida con el 9-AC.

#### IV. ELECTROFORESIS EN GELES DE PLACA

Para investigar el concepto de que la miotonía experimental se manifiesta como un defecto generalizado en las membranas celulares, se analizaron los perfiles electroforéticos unidimensionales de las proteínas membranales de eritrocitos de animales normales y miotonizados farmacológicamente.

Las muestras de ratas testigo y las de ratas tratadas con el 20,25-D mostraron un perfil proteico muy similar entre sí. En cambio, las muestras de ratas tratadas con el 9-AC tuvieron diferencias significativas con el grupo testigo; en el primer grupo se observó la disminución de dos bandas polipeptídicas mayores que se desplazan en las regiones de 26,000 y 29,000 daltones de peso molecular, se incrementó una banda en la región de 59,000 daltones al igual que en la de 135,000. Además, se observó un ligero incremento en una banda de menor intensidad que migra en la región de 85,000 daltones de peso molecular.

Algunos estudios han sugerido que la miotonía puede representar un defecto en las membranas celulares generalizado. A pesar de que hay una mayor fluidez en las membranas eritrocíticas de pacientes con miotonía distrófica y miotonía congénita (Butterfield et al., 1976) y anomalías en la función de algunas enzimas de dichas membranas (Rüdel y Lehmann-Horn, 1985) no se han observado alteraciones de los patrones electroforéticos de proteínas membranales de hematíes de pacientes con esas miopatías de origen natural (Roses y Appel, 1975). Además, se ha descrito que los hematíes de animales tratados con el 20,25-D tienen mayor fluidez en su membrana (Butterfield y Watson, 1977) y alteraciones en funciones enzimáticas (Nagatomo y Peter, 1975; Peter et al., 1973) y que el patrón electroforético de las proteínas no cambia, tal como se muestra en este trabajo. Lo anterior parece indicar que en los procesos patológicos anteriormente señalados hay alteración en la función de algunas enzimas membranales sin cambios en el perfil electroforético, lo que sugiere que dichas anomalías se relacionan con cambios en el microambiente membranal más que en las cantidades relativas de las proteínas de dichas membranas. De cualquier forma, se requiere de mayores estudios que señalen si dichas enfermedades constituyen en realidad un defecto membranal generalizado.

En contraste con el 20,25-D, el 9-AC es un agente que al parecer origina alteraciones más específicas en animales de experimentación (Morales-Aguilera, 1987) tales como una inducción del fenómeno miotónico más rápida y de efectos más intensos, entre otras. Si en realidad el 9-AC es un bloqueador específico de los canales de cloro de las membranas celulares, las alteraciones en los polipéptidos de las bandas señaladas anteriormente, probablemente indiquen alguna relación directa

o indirecta con el canal aniónico del eritrocito que en alguna forma esté relacionada con el síndrome miotónico. Sin embargo, no se puede descartar un posible efecto colateral del 9-AC que no participe en la inducción de miotonía.

Por último, se hace hincapié en que en este tipo de investigaciones se emplean técnicas bioquímicas para explorar las características de varios desordenes de membranas inducidos experimentalmente. De valor adicional será el utilizar los estudios de patología experimental para contribuir a la comprensión de aspectos normales de estructura y función de las membranas. Además, con estos trabajos se proporciona una oportunidad para traducir alteraciones funcionales de la membrana en términos bioquímicos y se contribuye a explicar los mecanismos fisiológicos normales.

## CONCLUSIONES

De este trabajo se concluye que:

1. Las ratas Sprague-Dawley son más sensibles a la acción del 9-AC que las Long-Evans, ya que presentan alteraciones hematológicas y bioquímicas que no se habían descrito en las últimas.
2. Las alteraciones hematológicas y bioquímicas en los animales miotónicos son más severas en los animales tratados con el 20,25-D que en los que recibieron el 9-AC. Estas alteraciones probablemente se deben a efectos colaterales de los fármacos que no se relacionan con el síndrome miotónico ya que no se observan en la miotonía de origen natural y no se asocian con la intensidad de la miotonía.
3. La ausencia de cambios en el perfil electroforético de proteínas de membranas eritrocíticas de ratas tratadas con el 20,25-D parece indicar que las alteraciones funcionales en enzimas membranales encontradas por otros autores en animales tratados con este fármaco se deben a alteraciones en el microambiente membranal más que a cambios proteicos cuantitativos. Por otra parte, las alteraciones de las principales bandas polipeptídicas que migran en las regiones de peso molecular de 26,000, 29,000, 59,000 y 135,000 daltones en las muestras de animales tratados con el 9-AC sugieren que existe algún tipo de relación entre los polipéptidos que constituyen estas bandas y el transporte aniónico del eritrocito; sin embargo, no se puede descartar un efecto colateral del 9-AC que no se relacione con la miotonía. Por lo anterior, en este estudio se sugiere que los fármacos capaces de inducir el síndrome miotónico también pueden afectar a las membranas celulares en forma más generalizada.

LITERATURA CITADA

1. Adrian R.H., Bryant S.H. 1974. On the repetitive discharge in myotonic muscle fibres. *J. Physiol. (London)*. 240: 505-513.
2. Atkinson J.B., Swift L.L., Lankford P.G., LeQuire V.S. 1980. A generalized membrane defect in hereditary myotonia: studies of erythrocytes in an animal model and patients. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 163: 69-75.
3. Barbosa J., Nuttal F.O., Kennedy W., Goetz F. 1974. Plasma insulin in patients with myotonic dystrophy and their relatives. *Medicine*. 53: 307-323.
4. Brown G.L., Harvey A.M. 1939. Congenital myotonia in the goat. *Brain*. 62: 341-363.
5. Bryant S.H., Morales-Aguilera A. 1971. Chloride conductance in normal and myotonic muscle fibers and the action of monocarboxylic acids. *J. Physiol. (London)*. 219: 363-383.
6. Butterfield D.A., Chesnut D.B., Appel S.H., Roses A.D. 1976. Spin label study of erythrocyte membrane fluidity in myotonic and Duchenne muscular dystrophy and congenital myotonia. *Nature (London)*. 263: 151-161.
7. Butterfield D.A., Watson W.E. 1977. Electron spin resonance studies of an animal model of human congenital myotonia: increased membrane fluidity in rats with 20,25-diazacholesterol-induced myotonia. *J. Membr. Biol.* 32: 165-176.

8. Caughey J.E. 1968. Transitional forms between myotonia congenita, dystrophia myotonica and paramyotonia congenita. N.Z. med. J. 67: 347-350.
9. Chalikian D.M., Barchi R.L. 1980. 20,25-Diazacholesterol myotonia: biochemical characteristics of the sarcolemma. Neurology. 30: 423.
10. Chalikian D.M., Barchi R.L. 1982a. Sarcolemmal desmosterol accumulation and membrane physical properties in 20,25-Diazacholesterol myotonia. Muscle & Nerve. 5: 118-124.
11. Chalikian D.M., Barchi R.L. 1982b. Membrane desmosterol and the kinetics of the sarcolemmal ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase in myotonia induced by 20,25-Diazacholesterol. Exp. Neurol. 77: 578-589.
12. D'Alonzo A.J., McArdle J.J. 1982. An evaluation of fast- and slow-twitch muscle from rats treated with 20,25-Diazacholesterol. Exp. Neurol. 78: 46-66.
13. D'Costa W.A., Smigura F.C., Kulhay K., Angel A. 1977. Effects of clofibrate on lipids synthesis, storage, and plasma Intralipid clearance. J. Lab. Clin. Med. 90 (5): 823-836.
14. Dubowsky K.M. 1962. An o-toluidin method for body fluid glucose determination. Clin. Chem. 8: 125.
15. Eyzaguirre C., Folk B.P., Zierler K.L., Lillenthal J.L. 1948. Experimental myotonia and repetitive phenomena: the veratrinic effect of 2,4-dichlorophenoxyacetata (2,4-D) in the rat. Am. J. Physiol. 155: 69-77.

16. Goodman S.R., Shiffer K. 1983. The spectrin membrane skeleton of normal and abnormal human erythrocytes: a review. *Am. J. Physiol.* 244: C121-C141.
17. Hainline A. 1958. Haemoglobin. En: *Standard Methods of clinical chemistry*. Editado por Seligson, D. Academic Press Inc. Vol 2.
18. Hegyeli A., Szent-Györgyi A. 1961. Water and myotonia in goats. *Science*. 133: 1011.
19. Jiménez-Salas Z., Villegas-Navarro A., Morales-Aguilera A. 1984. Estudios en modelos de miotonía inducida crónicamente: Aspectos hematológicos y bioquímicos. *Memorias del VIII Congreso Nacional de Farmacología*. 21 al 24 de Marzo. Monterrey N.L. p 86.
20. Jiménez-Salas Z., Villegas-Navarro A., Morales-Aguilera A. 1985. Estudios en modelos de miotonía inducida crónicamente: II Aspectos bioquímicos. *Memorias del IX Congreso Nacional de Farmacología*. 25 al 28 de Marzo. Tampico Tamps. p 70.
21. Kuhn E. 1973. Myotonia: the clinical evidence. En: *New Developments in Electromyography and Clinical Neurophysiology*. Editado por Desmedt J.E. Karger Basel Vol I. p 413-419.
22. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
23. Laskowski M.B., Dettbarn W.D. 1977. The pharmacology of experimental myopathies. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 17: 387-409.

24. Lipicky R.J., Bryant S.H., Salomon J.H. 1971. Cable parameters, sodium, potassium, chloride and water content and potassium efflux in isolated external intercostal muscle of normal volunteers and patients with myotonia congenita. *J. Clin. Invest.* 50: 2091-2103.
25. Lowry D.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
26. Lynch M.J., Raphael S.S., Mellor L.D., Spare P.D., Inwood M.J.H. 1972. *Métodos de laboratorio*. 2a. edición. Editorial Interamericana. p 754-755.
27. Marchesi V.T., Furthmayr H., Tomita M. 1976. The red cell membrane. *Ann. Rev. Biochem.* 45: 667-698.
28. Moffett R.B., Tang A.H. 1968. Skeletal muscle stimulants. Substituted benzoic acids *J. Medin. pharm. Chem.* 11: 1020-1022.
29. Morales-Aguilera A. 1987. Modelos experimentales de miopatías. En: *Músculos esquelético y cardíaco (bases fisiológicas)*. 1a edición Editado por Muñoz J., Pastelín G. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas y Alhambra Mexicana. p 275-300.
30. Nagatomo T., Peter J.B. 1975.  $(Na^+ + K^+)$ -ATPase activity in rats with 20,25-Diazacholesterol-induced myotonia. *Exp. Neurol.* 47: 97-104.
31. Niebrój-Dobosz I., Kwieciński H., Mrózek K. 1976. Plasma membranes of muscle in experimental myotonia in rats. *J. Neurol.* 213: 353-360.



32. Palade P.T., Barchi R.L. 1977a. Characteristics of the chloride conductance in muscle fibers of the rat diaphragm. *J. Gen. Physiol.* 69: 325-342.
33. Palade P.T., Barchi R.L. 1977b. On the inhibition of muscle membranes chloride conductance by aromatic carboxylic acids. *J. Gen. Physiol.* 69: 879-896.
34. Peter J.B., Andiman R.M., Bowman R.L., Nagatomo T. 1973. Myotonia induced by diazacholesterol: increased  $(Na^+ + K^+)$  ATPase activity of erythrocyte ghost and development of cataracts. *Exp. Neurol.* 41: 738-744.
35. Peter J.B., Dromgoole S.H., Campion D.S., Stempel K.E., Bowman R.L., Andiman R.M., Nagatomo T. 1975. Experimental myotonia and hypocholesterolemic agents. *Exp. Neurol.* 49: 115-122.
36. Platt D.S., Thorp J.M. 1966. Changes in the weight and composition of the liver in the rat, dog and monkey treated with ethyl chlorophenoxyisobutyrate. *Biochem. Pharmacol.* 15: 915-925.
37. Powanda M.C., Henriksen E.L., Ayala E., Canonico P.G. 1976. Clofibrate-induced alterations in serum proteins patterns. *Biochem. Pharmacol.* 25: 785-788.
38. Ramos-Ramirez E.G., Lázgare-Bello C., Morales-Aguilera A. 1983a. Effects of long-term administration of anthracene-9-carboxylic acid (9-AC) on young and adult rats. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 26: 21-23.

39. Ramos-Ramírez E.G., Teixeira de Aranda F., Becerril-Montes A., Morales-Aguilera A. 1983b. Histological and ultrastructural observations on rat skeletal muscle treated with anthracene-9-carboxylic acid (9-AC). Memorias de la Joint Meeting of the Western Pharmacology, Texas Pharmacology y AMEFAR, Puerto Vallarta Mexico. p 111.
40. Ravin A. 1940. Studies in dystrophia myotonica. Arch. Neurol. Psychiat. 43: 649-668.
41. Reinhold J.G. 1953. Total protein, albumin and globulin. En: Standard Methods of Clinical Chemistry. Editado por Seligson D. Academic Press Inc. Vol 1 p 21-23.
42. Roses A.D., Appel S.H. 1973. Protein kinase activity in erythrocyte ghost of patients with myotonic muscular dystrophy. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70 (6): 1865-1869.
43. Roses A.D., Appel S.H. 1978. Inherited membrane disorders of muscle: Duchenne muscular dystrophy and myotonic muscular dystrophy. En: Physiology of Membrane Disorders. Editado por Andreoli T.E., Hoffman J.F. y Fanestill D.D. Plenum Medical Book Co. N.Y. y Londres. p 801-815.
44. Roses A.D., Appel S.H., Butterfield D.A., Miller S.E., Chesnut D. B. 1975. Specificity of biochemical and biophysical test in Duchenne and Myotonic muscular dystrophy, carrier states, and congenital myotonia. Trans. Amer. Neurol. Assoc. 100: 131-134.
45. Rüdell R., Lehmann-Horn F. 1986. Membrane changes in cells from myotonia patients. Physiological Reviews. 65 (2): 310-356.

46. Rüdol R., Senges J. 1972. Experimental myotonia in mammalian skeletal muscle: changes in membrane properties. *Pflügers Arch.* 331: 324-334.
47. Samaha F.J., Schroeder J.M., Rebeiz J., Adams R.D. 1967. Studies on myotonia: biochemical and electron microscopic studies on Myotonia Congenita and Myotonia Dystrophica. *Arch. Neurol.* 17: 22-23.
48. Schröder J.M., Kuhn E. 1968. Zur ultrastruktur der muskelfaser bei der experimentellen "Myotonie" mit 20,25-diazacholesterin. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol.* 344: 181-195.
49. Sherman I.W. 1965. Membrane structure and function of malaria parasites and the infected erythrocyte. *Parasitology.* 91: 609-645.
50. Steinberg D., Avigan J. 1960. Studies of cholesterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 235: 3127-3129.
51. Strümpell A. 1881. Tonische rämpfe in willkürlich bewegten Muskeln (Myotoni Congenita). *Ber. Klin. Wochenschr.* 9: 119-121.
52. Studier F.W. 1973. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.* 79: 237-248.
53. Tanner M.J.A., Boxer D.H. 1972. Separation and some properties of the major proteins of the human erythrocyte membrane. *Biochem. J.* 129: 333-347.
54. Tevaarwerk G.J.M., Hudwon A.J. 1977. Carbohydrate metabolism and insulin resistance in myotonia dystrophica. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44: 491-498.

55. Thomsen J. 1876. Tonische krämpfe in villkürlich beweglichen muskeln in folge von ererbter psychischer disposition (Ataxia muscularis?). Arch. Psychiat. Nervenkr. 6: 702-718.
56. Villegas-Navarro A., Martínez-Morales M., Morales-Aguilera A. 1986. Pharmacokinetics of anthracene-9-carboxylic acid, a potent myotonia-inducer. Arch. in Pharmacodyn. 280: 5-21.
57. Vondruska J.F., Greco R.A. 1973. Certain hematologic and blood chemical values in Charles River C.D. albino rats. Bull. Am. Soc. Vet. Clin. Pathol. 2: 3-17.
58. Wallis I., Koenig E. 1980. Effects of denervation on the composition and synthesis of sarcolemmal proteins. Biochim. Biophys. Acta. 599: 518-527.
59. Wilkening J., Wolpert F., Schwandt P. 1978. Glycolytic metabolites and adenosine triphosphate in skeletal and cardiac muscle of rats after clofibrate feeding. Biochem. Pharmacol. 27 (2): 244-245.
60. Winer N., Kula D.M., Baer R.D., Langley P.L., Burns T.W. 1966. Myotonic response induced by inhibitors of cholesterol biosynthesis. Science. 153: 312-313.
61. Winer N., Mart J.M., Somers J.E., Wolcott L., Dale H.E., Burns T. W. 1965. Induced myotonia in man and goat. J. Lab. Clin. Med. 66: 758-769.
62. Zar J.H. 1974a. Biostatistical Analysis. Cap. 11. Multisample Hypotheses. Editorial Prentice-Hall Inc. Englewood Cliff, N.J. p 139-142.

63. Zar J.H. 1974b. *Biostatistical Analysis*. Cap. 12. Multiple Comparisons. Editorial Prentice-Hall Inc. Englewood Cliff, N.J. p 151-155.
64. Zlatkis A., Zak B., Boyle A.J. 1953. A new method for the direct determination of serum cholesterol. *J. Lab. Clin. Med.* 41: 486-492.

