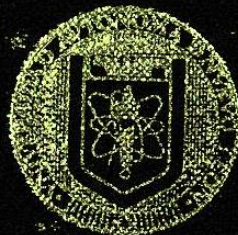


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ELECTROFORESIS DE PROTEINAS
MEMBRANALES ERITROCITICAS DE RATAS
EXPUESTAS A LA ADMINISTRACION DE
CLOFIBRATO Y 20, 25-DIAZACOLESTEROL Y
SU POSIBLE RELACION CON LOS EFECTOS
FARMACOLOGICOS.

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. ADRIANA SAMPAYO REYES

MONTERREY, N. L. AGOSTO DE 1987.

TM

Z5320

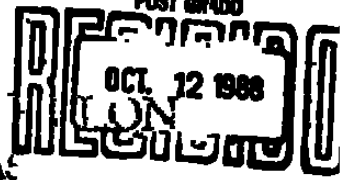
FCB

1987

S2



1020066502



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

FIRMA



ELECTROFORESIS DE PROTEINAS
MEMBRANALES ERITROCITICAS DE RA
EXPUESTAS A LA ADMINISTRACION DE
CLOFIBRATO Y 20, 25-DIAZACOLESTER Y
SU POSIBLE RELACION CON LOS EFECTOS
FARMACOLOGICOS

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. ADRIANA SAMPAYO REYES

MONTERREY, N. L.

AGOSTO DE 1987

TM
ZS320
FCB
1987
S-2



153317

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

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS MEMBRANALES ERITRO
CITICAS DE RATAS EXPUESTAS A LA ADMINISTRACION
DE CLOFIBRATO Y 20,25-DIAZACOLESTEROL Y SU PO-
SIBLE RELACION CON LOS EFECTOS FARMACOLOGICOS.

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. ADRIANA SAMPAYO REYES

COMISION DE TESIS

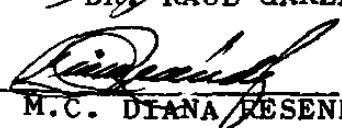
APROBADA:

DIRECTOR:



DR. RAUL GARZA CHAPA

SECRETARIO:



Q.B.P. M.C. DIANA RESENDEZ PEREZ

VOCAL:



BIOL. M.C. RICARDO CERDA FLORES

DIRECTOR EXTERNO:



DR. ANTONIO MORALES AGUILERA

MONTERREY, N.L.

AGOSTO DE 1987.

DEDICATORIA

La dedicatoria primordial del presente trabajo va dirigida a mis mejores maestros, quienes han sido y serán siempre el pilar más fuerte que sostenga mi vida.

Mis Padres:

Sr. Ramón Sampayo Lozano

Sra. Ma. Luisa Reyes de Sampayo

Como símbolo de todo el cariño que guardo hacia ellos.

Mis hermanos:

Ramón

Nancy

Letty

Linda

Ana Luisa

Marlene

René

A mis familiares y amigos.

RECONOCIMIENTO

Quiero expresar mi agradecimiento, muy particularmente al Dr.G.Antonio Morales Aguilera por haberme orientado y otorgado desinteresadamente la mayor parte de su tiempo. Su experiencia, unida al interés en el acercamiento a la investigación, han contribuido en mi superación. Deseo hacer constar que me he visto recompensada, al aprender mucho más de lo que podría incluir en este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste, I.M.S.S. y a todo el personal por las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Raúl Garza Chapa, que con sus valiosas enseñanzas y entusiasmo me han impulsado a superarme, además por ser director interno de el presente estudio.

Al M.C. Ricardo M. Cerda Flores por su gran amistad y apoyo intelectual recibido durante el desarrollo de la presente investigación.

A la M.C. Diana Reséndez Pérez por formar parte de la comisión de tesis y las críticas que contribuyeron a la elaboración del mismo.

Al Q.B.P. Jacinto Careaga O., Q.F.B. Carolina Trujillo, Rafael Gámez V., Leticia Treviño T. y a todos los integrantes de la División de Farmacología donde se llevó a cabo este estudio, porque contribuyeron a una estancia más agradable en el laboratorio.

Al Dr. Salvador L. Said Fernández por sus valiosos consejos que fueron parte de mi formación, así como a las personas que integran la División de Biología Celular.

Al Dr. Reyes Taméz Guerra, Subdirector de la Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L., por su apoyo y cooperación recibidos durante el trayecto de la maestría.

Al Q.B.P. Zacarías Jiménez Salas por toda su cooperación y compañerismo en el presente estudio.

A la Q.C.B. Ma. de los Angeles Rojas Alvarado por sus valiosos consejos a través de mi estancia en la Unidad.

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

Al M.V.Z. Arturo Guerrero M., Sr. Mateo Trejo T. y a Francisco Reséndez R., encargados del Bioterio de la Unidad por su cooperación.

Al Sr. Luis Rodríguez Rodríguez por su amable disposición para facilitarme parte del material para la realización del presente estudio.

A mis maestros Biol. Jorge Verduzco, M.C. Biol. Carlos H. Leal Garza, Biol. Mario Morales V., que fueron parte de mi formación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca complementaria que me otorgó para la realización de mis estudios.

A mi tía Aurora Sepúlveda de Villareal quien ha sido un apoyo en el transcurso de mi vida.

A mis amigas Nancy P., Blanca A., Marivel G., Blanca E., Carolina de Luna, Rocío, Ana y Adriana C. por la confianza que depositaron en mí y de quienes guardo buenos recuerdos.

A todos mis compañeros, familiares y aquellas personas que de una forma o de otra colaboraron en la realización de este trabajo, mi mayor agradecimiento.

Lo importante en la vida no es darse jamás por satisfecho de sí mismo o de sus conocimientos o de las pequeñas victorias, sino apuntar cada día a mejores triunfos y a valores duraderos.

ANONIMO

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

C O N T E N I D O

RESUMEN -----	1
INTRODUCCION -----	5
ANTECEDENTES	
a).- La Miotonía -----	8
b).- Características de las Drogas Inductoras de Miotonía -----	10
c).- Miotonía Inducida por Agentes Químicos --	10
d).- Bioquímica del Eritrocito -----	20
e).- Alteraciones de Proteínas Membranales de Eritrocitos en algunas Miopatías -----	23
MATERIALES Y MÉTODOS	
a).- Material Biológico -----	24
b).- Equipo -----	24
c).- Origen Comercial de los Reactivos -----	25
d).- Preparación de las Soluciones de Fármacos	26
e).- Preparaciones Experimentales -----	26
f).- Aislamiento de las Membranas de Eritroci- tos -----	26
g).- Preparación de las Soluciones para la - Electroforesis ---	28
h).- Preparación del Gel -----	30
i).- Preparación de los Paquetes Cremosos (mem- branas) para la aplicación en el Gel ----	31
j).- Colocación de las Placas con el Gel en la Cámara para la Electroforesis -----	34
k).- Tinción del Gel -----	36
l).- Métodos Estadísticos -----	36
m).- Densitometría -----	36

RESULTADOS

a).- Electroforesis en Geles de Placa con Poli acrilamida -----	39
b).- Pruebas Hematológicas	
1.- Hemoglobina -----	45
2.- Hematocrito -----	45
c).- Pruebas Bioquímicas	
1.- Proteínas séricas totales -----	46
2.- Colesterol -----	46
3.- Glucosa -----	46

DISCUSION Y CONCLUSIONES

a).- Electroforesis en Geles de Placa con Poli acrilamida -----	53
b).- Pruebas Hematológicas -----	56
c).- Pruebas Bioquímicas -----	
1.- Proteínas séricas totales -----	59
2.- Colesterol -----	60
3.- Glucosa -----	62

CONCLUSIONES GENERALES Y PRESPECTIVAS -----	65
---	----

LISTA DE FIGURAS -----	66
------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS -----	67
-----------------------------	----

BIBLIOGRAFIA -----	69
--------------------	----

R E S U M E N

La miotonía consiste en una contracción anormalmente persistente del músculo esquelético después de una estimulación mecánica o eléctrica, debida a una anomalía del sarcolema; esta anomalía puede presentarse en el hombre en forma natural y además puede ser inducida en animales de laboratorio mediante clofibrato y el 20, 25-diazacolesterol (20,25-D). Estos fármacos son utilizados en el tratamiento de pacientes con hiperlipidemias ya que disminuye las concentraciones de triacilglicéridos y colesterol en el suero. Además de este efecto pueden producir algunos síntomas secundarios tales como debilidad, dolor muscular y un síndrome parecido al de la miotonía.

Atkinson y col. (1980) sugieren que la miotonía hereditaria puede ser la manifestación de un defecto de membrana generalizado, por lo que en la miotonía inducida pudieran presentarse cambios en otros tipos celulares además de en los músculos, por ejemplo, en los eritrocitos. El músculo esquelético es el órgano más estudiado en pacientes con miotonía y en modelos experimentales. Se conoce poco acerca de los cambios que ocurren en las membranas de eritrocitos en una miotonía experimental. Por lo que en el presente estudio se intentan determinar algunos cambios cualitativos en las proteínas de la membrana de eritrocitos (obtenidas de ratas tratadas con dos drogas miotonizantes) que pueden determinarse mediante electroforesis, que además estén relacionados con las proteínas que tienen como principal función el transporte de cloruros, ya que se ha demostrado que la principal causa de la miotonía natural o inducida es una gran disminución en la conductancia al ion cloruro. Además se determinaron algunas variables

hematológicas y bioquímicas que pueden dar alguna información adicional sobre cambios que ocurran en los eritrocitos o en vías metabólicas generales.

Se llevó a cabo el siguiente diseño experimental: se utilizaron ratas macho Sprague Dawley de 40 días de nacidas; se formaron tres grupos de cinco ratas cada uno y se les administró clofibrato (300 mg.kg^{-1}) al primer grupo, 20,25-D (50 mg.kg^{-1}) al segundo grupo y el tercer grupo se mantuvo como testigo. Las drogas se administraron por vía oral mediante una cánula esofágica. A los 40 días de iniciado el experimento se sacrificaron las ratas; mediante punción cardiaca se obtuvo sangre total y suero. A las muestras de sangre total se les trató mediante la técnica de Atkinson y col.(1980) para obtener membranas, con las que posteriormente se llevó a cabo la electroforesis en gel discontinuo de DSS-poliacrilamida por el método de Laemmli (1970). Además se determinaron la hemoglobina y el hematocrito. Las muestras de suero se utilizaron para determinar glucosa, colesterol y proteínas séricas totales.

Los animales tratados con clofibrato y con 20,25-D mostraron menos signos evidentes de miotonía, como rigidez muscular o dificultad para caminar, que las que producen drogas más potentes como el ácido-9-antracén-carboxílico (9-AC). Sin embargo, a las dosis usadas en el presente estudio, otros autores han demostrado la presencia de miotonía por medio de electromiografía.

El perfil proteico de membranas de eritrocitos de ratas tratadas con clofibrato mostró la disminución de las bandas con un peso molecular aparente de 200 000, 78 000 y 35 000 daltones.

Es posible que el clofibrato al afectar a las proteínas correspondientes a las bandas 2, 2.1, 2.3, 2.6, 4.1 y 6 actúe además, directa o indirectamente, sobre la funcionalidad de la banda 3 o a la inversa que al actuar sobre la banda 3 se modifiquen las proteínas antes mencionadas. Además, no se descarta la posibilidad de que se manifiesten cambios conformacionales o funcionales en las proteínas ya que mediante la técnica de electroforesis no se pueden determinar dichos cambios.

Por otro lado, no hubo cambios en la hemoglobina, hematocrito, proteínas séricas totales y glucosa de animales tratados con clofibrato, lo cual indica que aparentemente no se alteran estas variables a la dosis utilizada en el presente estudio. El colesterol sí disminuyó significativamente, lo cual era de esperarse, pues es una droga que actúa disminuyendo los niveles de colesterol en suero, lo que confirma que la metodología utilizada es confiable.

En ratas tratadas con 20,25-D no apareció cambio alguno en las bandas del perfil proteico determinadas mediante electroforesis. Se sugiere que las alteraciones membranales inducidas por esta droga que han sido descritas por otros autores, deben atribuirse a modificaciones en la estructura lipídica de la membrana o a cambios conformacionales en las proteínas no detectadas en este estudio. Ya que el 20,25-D altera significativamente los niveles de colesterol el cual está importantemente asociado a la membrana principalmente en la estructura, es posible que las disminuciones de la hemoglobina y el hematocrito puedan ser consecuencia de alteraciones a nivel de la membrana, pues se ha demostrado que el 20,25-D puede aumentar la fluidez de la misma y ésto a su vez la fragmentación de eritrocitos acompañada de una disminución de estos parámetros.

Cabe mencionar que las dosis utilizadas aparentemente no modifican el metabolismo de las proteínas séricas y glucosa. Además las alteraciones en las variables utilizadas podrían deberse a un efecto secundario de la droga que pudiera no estar relacionado directamente con la miotonía inducida; tanto como para el clofibrato y el 20,25-D.

El presente estudio abre las puertas para investigar alteraciones que no fueron posible detectar mediante electroforesis, como determinar la funcionalidad de la banda 3, midiendo la conductancia al ion cloruro, marcándolo radiactivamente, para relacionar los cambios en las proteínas vecinas a la banda 3, con posibles cambios en la conductancia al cloruro. Además, se pretende conocer si los cambios encontrados en el presente estudio son reversibles, pues se ha demostrado que al eliminar la administración de la droga los síntomas desaparecen gradualmente. Por otro lado, se podrían demostrar alteraciones en la morfología de la membrana de eritrocitos obtenidas de ratas tratadas con drogas miotonizantes, mediante fotografías en barrido. Por último, ya que el clofibrato es una droga utilizada actualmente en pacientes, para disminuir los niveles de colesterol, sería de gran interés conocer si las alteraciones observadas en el presente estudio, también se manifiesta en pacientes a los cuales se administra el clofibrato.

I N T R O D U C C I O N

Una de las enfermedades que afectan directamente a los músculos estriados del hombre y de otros mamíferos es la miotonía (enfermedad de Thomsen) que se caracteriza por la relajación anormalmente lenta del músculo voluntario, que semeja una contractura. En el hombre es una enfermedad hereditaria que se presenta como autosómica dominante. El defecto responsable de la miotonía se ha localizado en la membrana muscular donde disminuye la conductancia al ion cloruro. El paso del ion cloruro a través de la membrana se lleva a cabo mediante proteínas integrales. Se desconoce si estas proteínas se encuentran alteradas o modificadas en una miotonía natural o inducida.

Se ha demostrado que el síndrome muscular miotónico puede manifestarse como un defecto de membrana generalizado, es decir, además de estar alterada la membrana muscular también se modifican otros tipos de membranas. Por otro lado, existen antecedentes de que en los eritrocitos los movimientos del ion cloruro a través de la membrana son funcionalmente importantes, al igual que en el sarcolema; y como en una miotonía natural o inducida se ha demostrado una disminución en la conductancia al ion cloruro en el sarcolema, es pues posible, que en estados miotónicos pudieran alterarse las proteínas encargadas del transporte al cloruro en la membrana eritrocítica, si realmente en una miotonía inducida también se manifiesta este defecto en forma generalizada.

Además, la miotonía puede ser inducida en animales de laboratorio mediante algunos agentes químicos (drogas hipocolesterolemiantes) tales como clofibrato y

el 20,25-diazacolesterol.

Cabe destacar que el comportamiento miotónico en animales de laboratorio no es igual al que se presenta en el humano. Sin embargo, es importante conocer algunos mecanismos bioquímicos y fisiológicos. Por lo que en el presente trabajo se investiga la posibilidad de encontrar cambios cualitativos en las proteínas de membrana que pudieran ser detectados mediante la electroforesis, así como variaciones con algunos factores hematológicos y bioquímicos que podrían contribuir a una mejor comprensión de esta enfermedad.

H I P O T E S I S

Ya que en la miotonia natural se ha demostrado una disminución en la conductancia al ion cloruro en el sarcolema, lo cual está íntimamente relacionado con las proteínas que transportan estos aniones (banda 3) y además que esta enfermedad se manifiesta como un defecto de membrana generalizado, es posible que los agentes inductores de miotonia pueden modificar a proteínas eritrocíticas asociadas directa o indirectamente con el canal aniónico.

De acuerdo a la hipótesis planteada se diseñó la presente investigación induciendo miotonía experimental en ratas con dos drogas diferentes, con los siguientes objetivos.

- 1.- Determinar el perfil proteico de la membrana de eritrocitos de ratas normales y de ratas tratadas con clofibrato, mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida.
- 2.- Determinar y comparar algunos efectos farmacológicos inducidos por estas drogas con un grupo de ratas testigo sobre las variables biométricas siguientes:
 - a).- Concentración de hemoglobina.
 - b).- Hematocrito.
- 3.- Determinar y comparar algunos indicadores metabólicos tales como:
 - a).- Proteínas séricas totales.
 - b).- Colesterol.
 - c).- Glucosa.

A N T E C E D E N T E S

a).- La Miotonía.

El fenómeno de miotonía fue por primera vez descrito por Thomsen en 1867 como una condición hereditaria. Se ha descrito también en términos electrofisiológicos como una tendencia anormal de la membrana muscular a descargar un tren de potenciales de acción en respuesta a una sola estimulación (Brown y Harvey, 1939).

Esta enfermedad se presenta en el hombre y en algunos animales. En el hombre, la miotonía puede manifestarse como miotonía congénita, miotonía distrófica y paramiotonia; este último fenómeno se presenta sólo por exposición al frío (Caughey, 1968). Cabe mencionar que la miotonía distrófica es una enfermedad con un gran espectro de manifestaciones tales como debilidad muscular, cataratas, atrofia testicular, calvicie prematura y anormalidades endocrinas. Menos severa es la miotonía congénita en la que no se observa degeneración muscular alguna. Usualmente principia al nacimiento pero los síntomas pueden retrasar su aparición hasta el fin de la primera o aún de la segunda década de la vida (Walton, 1965).

Entre los síntomas que presentan los pacientes miotónicos se destaca la rigidez involuntaria de los músculos esqueléticos, que se manifiesta al iniciar súbitamente alguna actividad física. Esta rigidez involuntaria disminuye al continuar el ejercicio hasta desaparecer por completo, fenómeno conocido como "calentamiento" (Ravin, 1940).

El defecto responsable de la miotonía se ha localizado en la membrana muscular ya que el síndrome persiste aun después de aplicar curare a la placa neuromuscular, igualmente al seccionar el nervio o al seccionar los cordones anterolaterales de la médula espinal; pueden producirse descargas miotónicas estimulando al músculo en cualquier región y no necesariamente en la unión neuromuscular (Brown y Harvey, 1939 ; Eyzaguirre y col., 1948).

Una característica sobresaliente del músculo miotónico es la elevada resistencia eléctrica del sarcolema; particularmente aparece reducida la conductancia del ion cloruro (G_{Cl^-}). Esta característica se observa en la miotonía congénita y no se presenta en músculos sanos, por lo que se acepta que es la principal responsable del defecto miotónico (Bryant y Morales-Aguilera, 1971 ; Lipicky y col., 1971).

Diversas investigaciones acerca de la G_{Cl^-} en el músculo esquelético señalan que el ion cloruro podría transportarse a través de la membrana muscular por canales acuosos que podrían estar formados por proteínas integrales (Palade y Barchi, 1977 a). Se desconoce si en la miotonía tales canales se encuentran modificados o en menor cantidad que en el músculo normal.

El diagnóstico clínico de la enfermedad se realiza con electromiografía (EMG), ya que esta técnica permite observar que la fibra del músculo miotónico al despolarizarse produce un tren de potenciales de acción característico y al transformar esta señal a sonido emite un ruido que asemeja al ataque de un "avión de bombardeo" (Hofmann y Rowe, 1966). Existen otros métodos tales como pruebas funcionales bioquímicas y biofísicas. Todas ellas pueden usarse para la identificación de una miopa-

tía dada, así como para saber su evolución; desgraciadamente cuando se recurre a tales métodos generalmente la enfermedad ya está muy avanzada.

b).- Características de las Drogas Inductoras de Miotonía.

Los requerimientos moleculares de las drogas bloqueadoras de la conductancia al cloruro más importantes son las siguientes:

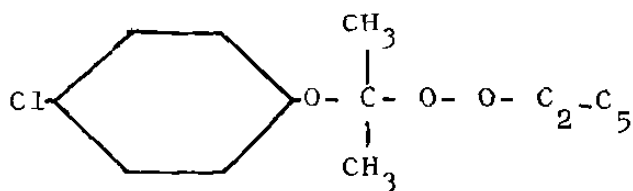
- 1.- La molécula debe ser plana.
- 2.- El ácido debe ser monocarboxílico.
- 3.- La posición del grupo carboxílico y de otros grupos sobre la molécula es crítica.
- 4.- Los compuestos más potentes tienen un tamaño y peso molecular similar (199 000 a 298 000 daltones).
- 5.- La molécula debe ser hidrofóbica.

La miotonía por medios químicos puede ser inducida por diferentes formas:

- 1.- Mediante agentes hipocolesterolemiantes (clofibrato y 20,25-diazacolesterol).
- 2.- Mediante ácidos aromáticos monocarboxílicos.
- 3.- Mediante aniones impermeables que sustituyen al cloro.

c).- Miotonía Inducida por Agentes Químicos.

Clofibrato: Su metabolito activo es el etil éster de clorofenoisobutirato y tiene la siguiente fórmula estructural.



Es un agente hipolipidemiante utilizado como terapéutico en el hombre para disminuir los niveles de colesterol y triacilglicéridos en suero (Mannisto y col., 1975). Actúa interfiriendo con la biosíntesis del colesterol antes de la formación del escualeno. Sin embargo, existen otros sitios en los que se presume su acción tal como se presenta en la figura 1 (Chevais, 1980).

Algunos efectos con su administración incluyen náusea, diarrea, leucopenia y algunas enzimas elevadas en suero. Debido a su toxicidad se considera que su uso puede ser dañino.

Langer y Levy (1968) fueron los primeros en observar que el clofibrato ocasionalmente causa un síndrome caracterizado por debilidad, dolor muscular, enzimas séricas elevadas tales como transaminasas, aldolasas, creatinfosfoquinasa. Estas complicaciones fueron secundarias a la administración en pacientes que tenían hiperproteí-nemia.

Geltener y col., (1975) observaron incrementada la excreción de creatinina en orina. Se ha encontrado que al eliminar la administración desaparecen los signos mio

páticos después de un tiempo. En pacientes con falla renal es mucho más frecuente la miotonía al igual que en pacientes con hipotiroidismo. En pacientes con diabetes provoca daños cardiomiopáticos.

Palade y Barchi (1977 b) informaron que la miotonía inducida por agentes químicos se desarrolla con más velocidad en músculos rápidos; esto es posible porque la conductancia al cloruro está conectada con el sistema de túbulos transversos, el cual está mucho más desarrollado en músculos rápidos. Además en este tipo de músculos es particularmente importante la estabilidad eléctrica de la superficie de la membrana (Ontell y col., 1979).

Kwieciński (1980) no observó respuesta miotónica al clofibrato en músculos sanos denervados. Esto podría sugerir que la miotonía inducida con clofibrato se desarrolla por acción directa de la droga sobre los músculos independientemente de la influencia neural.

Paul y Adibi (1979) demostraron que el clofibrato tiene profundos efectos sobre la histología, composición química y reacciones químicas del hígado.

El clofibrato es metabolizado a ácido clofíbrico, el cual interactúa con ciertos aminoácidos disminuyendo las concentraciones de éstos y provocando su oxidación en los músculos. Estas alteraciones pueden jugar un papel importante en los efectos miopáticos producidos por éste tipo de drogas (Paul y col., 1980).

Por otro lado el clofibrato también puede ser utilizado para inducir miotonía en ratas. Eberstein y Goodgold (1973) fueron los primeros en demostrar el desarrollo de miotonía en ratas.

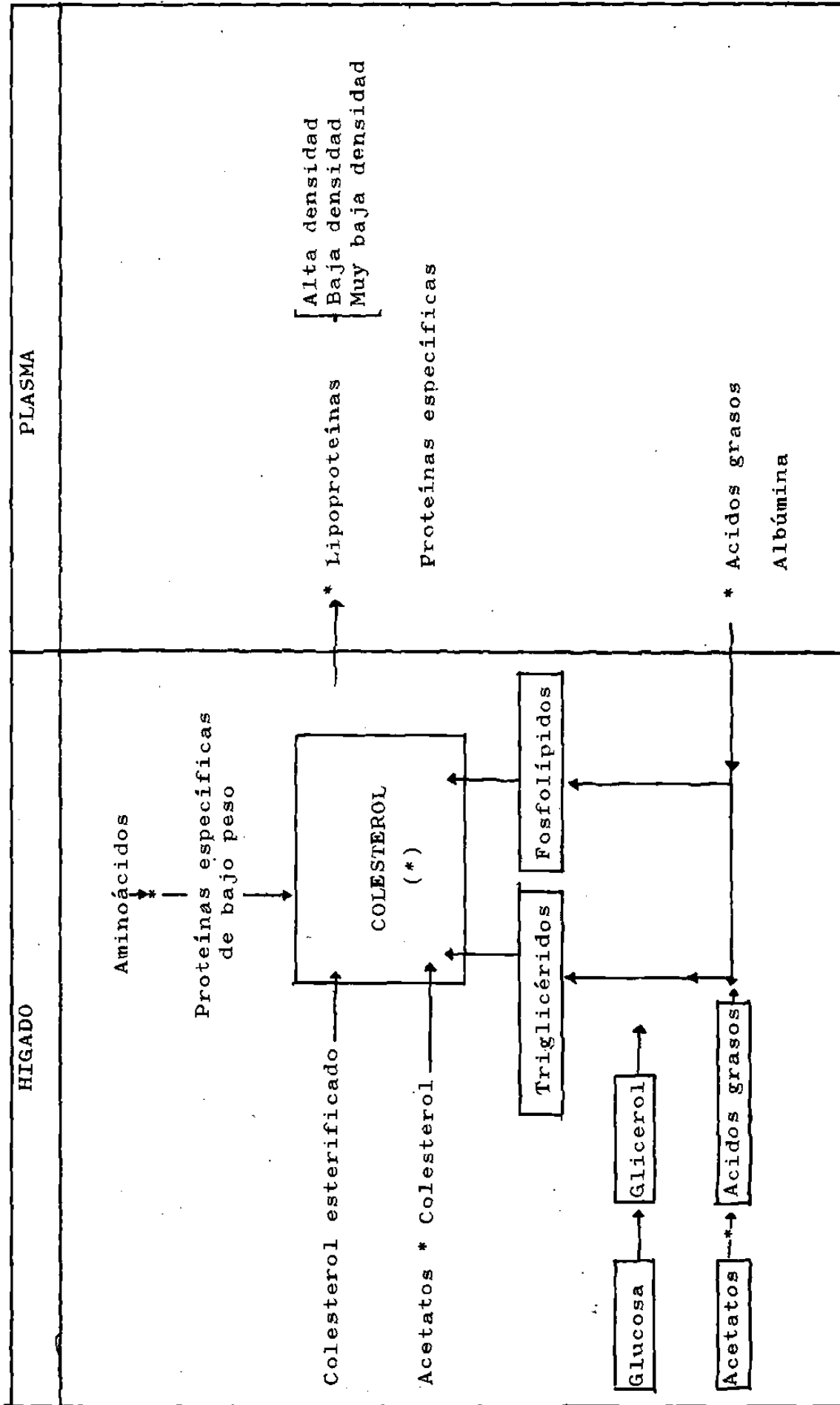
Estudios realizados por Kwieciński (1978) en ratas

macho Wistar, con un peso promedio de 200 g y recibiendo una dosis de 400 mg.kg^{-1} de peso diariamente mediante inyecciones, por un tiempo de tres a seis semanas, mostró que con esa dosis la concentración de clofibrato en suero es similar a la dosis terapéutica utilizada en el hombre. Además utilizó electromiogramas para evaluar cambios en la actividad muscular causada por la droga, lo cual apoya el trabajo realizado por Dromgoole y col. (1975b) quienes al utilizar una dosis de 300 mg.kg^{-1} de peso observaron el mismo efecto.

Wilkening y col. (1978) trabajando con ratas, observaron que el clofibrato puede interferir con el metabolismo de la glucosa en músculo. El glicógeno y todos los intermediarios de la hexosa-fosfato disminuyeron en músculo esquelético, así como también el contenido de glicógeno en músculo cardíaco.

Niebrój-Dobosz y Kwieciński (1983) estudiaron algunos indicadores bioquímicos que probablemente están asociados con la inducción de miotonía en músculo de ratas tratadas con clofibrato. Estudiaron el perfil proteico sarcolemal de electroforesis en geles de poliacrilamida, lo cual evidenció la disminución de las bandas proteicas de 200 000, 80 000 y 40 000 daltones de peso molecular.

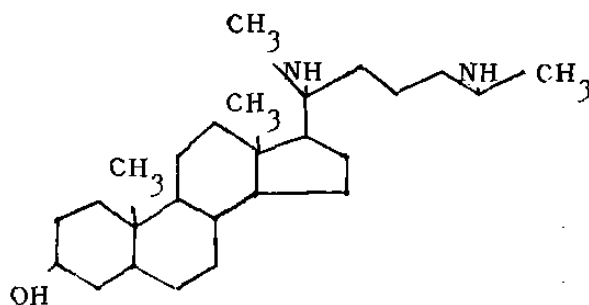
Por otro lado, administrando clofibrato a ratas, Peter y Campion (1977) observaron disminución de la actividad de la ATP asa (Na^+ , K^+) en membranas plasmáticas de músculo. Sin embargo, la actividad de esta enzima en eritrocitos fue normal. La administración de clofibrato disminuye el contenido de proteína en músculo y también la oxidación de glucosa y palmitato. Existe una infinidad de alteraciones producidas por la administración de esta droga; desgraciadamente, el mecanismo bioquímico



* Fig. 1. Algunas rutas de la biosíntesis del colesterol y los sitios en donde se presume que actúa el clofibrato (*).

por el cual el clofibrato produce cambios miopáticos es incierto.

20,25-Diazacolesterol: Es un análogo estructural del colesterol. Difiere de éste en que contiene sitios de la cadena sustituida por nitrógeno en los átomos de carbono 20 y 25. Tiene la siguiente fórmula estructural:



Winer y col. (1965) observaron el efecto miotónico en pacientes hipocolesterolémicos tratados con 20,25-diazacolesterol, los cuales presentaron espasmos musculares y un electromiograma similar al de la miotonía. A pacientes que recibieron 20,25-diazacolesterol por un par de meses y una dosis de 50 mg por día, se les efectuó una biopsia en la que se observó miopatía con atrofia de fibras musculares (Somers y Winer, 1966). La miotonía fue acompañada por cambios de esterol en el plasma y en la membrana del eritrocito del músculo, en donde disminuyó el total de esterol y colesterol, aumentando el desmosterol. Esta comisión requiere de la administración de la droga por varios días. Sin embargo, al término de la administración los efectos desaparecen gradualmente. Aunque muchos autores utilizan diferentes dosis y métodos de administración, la reacción miotónica siempre se observa.

Además del 20,25-D existen otros análogos del colesterol conteniendo diferentes sitios de la cadena sustituida con nitrógeno que también inducen miotonía en ratas (Kweciński, 1981).

Se ha observado que el 20,25-D produce cambios similares a los descritos en el humano, en cabras y en ratas. En estas últimas se han descrito signos característicos de la distrofia miotónica, así como atrofia testicular, daño al músculo cardíaco, liso, por lo que algunos autores (Fairhurst y col. 1976, Schruder y Khun 1968, Peter y col. 1973, Nagatomo y Peter, 1975) han considerado a la miotonía inducida por este agente como un modelo experimental de la miotonía distrófica humana.

Se ha creído que el desmosterol puede ser esencial para el desarrollo de la miotonía, ya que se ha demostrado que la administración simultánea de 20,25-D y dietas altas en colesterol previene la aparición de la miotonía. Sin embargo, otros agentes causan la disminución de colesterol en suero y músculo sin la acumulación de desmosterol (Peter y Champion, 1977; Seiler y col., 1975). Aunque el colesterol es importante para la función normal del sarcolema en el transporte iónico y es el mayor constituyente de las membranas biológicas, su papel biológico aún no está totalmente entendido.

El mecanismo bioquímico por el cual la acumulación de desmosterol puede disminuir la conductancia al cloruro es incierto. Se piensa que el desmosterol puede interactuar directamente con los componentes moleculares de la membrana relacionados con la conductancia al cloruro (Peter y Champion, 1977).

Winer y col. (1966) indujeron miotonía en ratas con los análogos del colesterol: 25-azacolesterol (0.1mg.kg^{-1})

24-azacolesterol (5 mg.kg^{-1}), 22,25-diazacolesterol (30 mg.kg^{-1}), SC-1382 (20 mg.kg^{-1}) y el SC-12998 (10 mg.kg^{-1}), observaron que todos ellos causaron reducción del colesterol y acumulación de desmosterol en músculo y plasma, mostrando que bloquean la conversión de desmosterol a colesterol (Fig. 2). También se ha demostrado un patrón alterado de fosfolípidos con algunos de ellos (Scrüder y Khun, 1968).

Niébroj-Dobosz y col. (1976) determinaron la actividad de algunas enzimas en la membrana plasmática de músculo de rata después de la administración de 20,25-D y observaron una disminución de la actividad de la ATP asa (Na^+ , K^+). Lo mismo observaron Nagatomo y col., en 1975.

La actividad máxima de la ATP asa (Na^+ , K^+) depende de la proporción adecuada de Na^+ / K^+ y una concentración adecuada de Cl^- . En la miotonía inducida por el 20,25-D se ha observado una disminución en la conductancia al Cl^- y una disminución en la concentración de Na^+ intracelular de las fibras del músculo, aunque no se ha observado una reducción de K^+ . Se piensa que la reducción de Na^+ intracelular incrementa la actividad de la ATP asa, pero no se encontraron alteraciones de Na^+ , K^+ o Cl^- en suero o células rojas (Peter y Campion, 1977).

Peter y Fiehn en 1973, observaron un aumento en la actividad de la ATP asa (Na^+ , K^+) de sarcolema y de membrana de eritrocitos después de la administración diaria de 20,25-D. Ellos concluyeron que el incremento en la actividad de esta enzima puede disminuir la conductancia al Cl^- que pudiera ser el resultado de la acumulación de desmosterol.

Aun son más diversos los resultados obtenidos por otros autores sobre la actividad de la ATP asa, Hull y

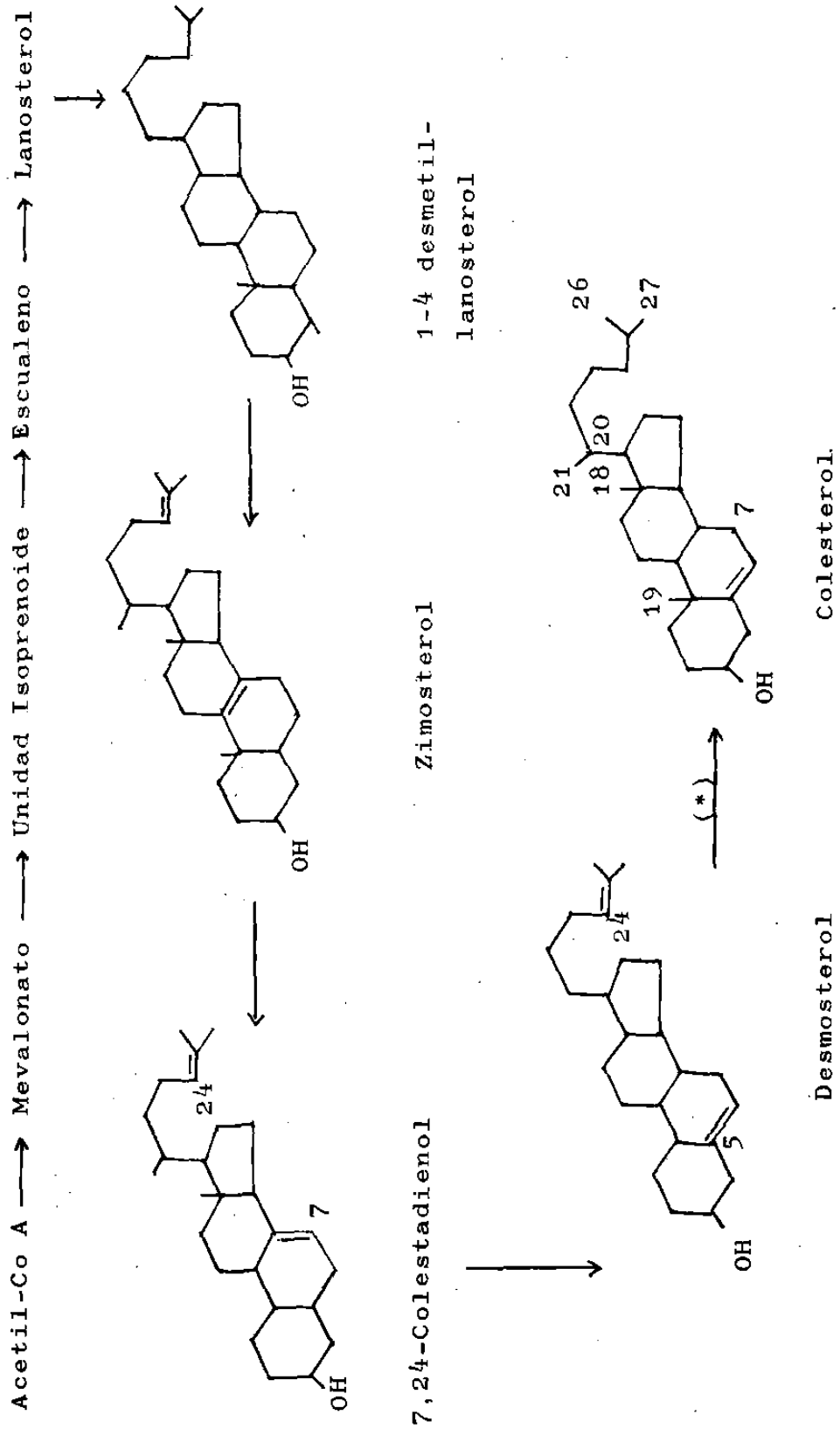


Fig. 2 Biosíntesis del colesterol presentando el sitio de acción del diazocolesterol (*) , aparentemente bloqueando la enzima desmosterol-reductasa.

Roses (1976) realizaron un estudio estequiométrico del transporte de Na^+ y K^+ en eritrocitos de pacientes con miotonía distrófica encontrando un intercambio de dos sodios por dos potasios. Sin embargo Hobbs y col. (1979) observaron una proporción normal. Tales divergencias sugieren que la actividad de la enzima ATP asa podría no jugar un papel importante en la miotonía.

Fiehn y Seiler (1975) demostraron que la actividad de la ATP-asa depende directamente del contenido de desmosterol en eritrocitos y sarcolema. De acuerdo a ellos la acumulación de desmosterol en la membrana plasmática estimula el efecto de transporte de la ATP-asa. Por otro lado, ellos mencionan que si la miotonía fuera realmente debida a un desorden en la membrana plasmática relacionada con lípidos, se podría esperar cambios en la actividad de otras enzimas transportadoras de cationes en el sarcolema tal como sucede con el aumento en la actividad de la ATP asa Ca^{++} y de la enzima p-nitrofenilfosfatasa, otra enzima unida a la membrana, inducida por el 20,25-D.

Butterfield y Watson (1977) llevaron a cabo estudios de resonancia magnética nuclear en membrana de eritrocitos de ratas tratadas con 20,25-D, observando un aumento en la fluidez. Cambios análogos se demostraron en miotonías distrófica y congénita (Butterfield y col. 1976). La fluidez de la membrana puede depender de su composición principalmente de la longitud de las cadenas hidrocarbonadas, de la presencia de insaturaciones de las mismas y del colesterol ya que éste mantiene la estabilidad mecánica de la membrana. Un aumento en la fluidez podría coincidir con una alteración en el patrón de ac. grasos y fosfolípidos, como lo describieron Khun y col. (1968). Las alteraciones en el estado físico de la membrana de eritrocitos presentes en diversos tipos de miotonías, sugieren, por lo tanto, que la miotonía está asociada con una anomalía generalizada de la membrana (Peter y col. 1975).

d).- Bioquímica del Eritrocito.

Para estudiar la organización molecular de la membrana celular, el primer paso consiste en aislarla del resto del citoplasma en la forma más pura que sea posible, para estudiarla luego con métodos bioquímicos y biofísicos.

Se han empleado métodos para aislar membranas plasmáticas de una gran variedad de células. En la mayor parte de los casos, la pureza de las fracciones obtenidas es controlada mediante microscopía electrónica y análisis enzimáticos entre otros métodos.

Las membranas plasmáticas pueden obtenerse con gran facilidad a partir de eritrocitos hemolizados. Los eritrocitos se tratan con soluciones hipotónicas que producen primero la hinchazón de la célula y luego la hemólisis. Las membranas obtenidas mediante este procedimiento suelen denominarse "fantasmas" de eritrocitos que pueden ser de dos tipos: Los "fantasmas" resellados que se logran mediante hemólisis suave seguida por un tratamiento con sustancias que restablecen las funciones de permeabilidad. Cuando la hemólisis es más drástica, la hemoglobina es extraída completamente ("fantasmas" blancos) y aunque estos "fantasmas" ya no pueden ser resellados para su estudio fisiológico, son útiles para el análisis bioquímico.

Se sabe más de la composición de la membrana de eritrocitos humanos que de otras células. Las proteínas representan 52 % de su masa, los lípidos 40 % y los hidratos de carbono 8 %. Los oligosacáridos están unidos tanto a los glicolípidos como a las proteínas (glicoproteínas) Robertis, 1984.

Las proteínas representan el componente fundamental de casi todas las membranas biológicas. Desempeñan un pa

pel, no sólo en la estructura mecánica de la membrana sino también en su permeabilidad, sea como transportadores o como canales y en las propiedades de regulación o reconocimiento de ligandos, además de otras funciones.

Las proteínas de la membrana de eritrocitos se clasifican en dos tipos: proteínas de membrana integrales las cuales se unen por el centro lipídico hidrofóbico y las proteínas de membrana superficiales, las cuales interactúan no-covalentemente con proteínas y lípidos de la superficie externa o de la interna de la membrana.

Para separar los polipéptidos de las membranas de los eritrocitos, el método generalmente usado consiste en disolverlas en un detergente iónico, el dodecil sulfato de sodio (DSS) y tratarlas luego por electroforesis en un gel de poliacrilamida. La separación en geles de poliacrilamida resuelve aproximadamente 40 constituyentes, de los cuales ocho a doce son los más importantes (Robertis, 1984).

Las proteínas de la banda III, son las proteínas transmembranales más abundantes en los eritrocitos. Atraviesa toda la membrana en forma de dímeros (o tetrámeros) y representa las partículas de 80 \AA en la criofractura. Tiene la función de intercambiar cloruros y bicarbonatos a través de la membrana (Rothstein y col., 1976).

Para explicar la función de la proteína de banda III se ha propuesto un modelo de canal aniónico que tiene un sitio con cargas positivas para la fijación de aniones y una barrera hidrofóbica para limitar su libre difusión. En este modelo se supone que el segmento que contiene el sitio de fijación puede existir en dos configuraciones diferentes; una mirando hacia afuera, la otra hacia adentro. De este modo podría actuar en el canal como una compuerta

con dos posiciones. Además, se supone que el sitio de fijación aniónica se halla en un segmento de 65 000 daltones (Rothstein y col., 1976) fig. 3.

Las proteínas superficiales no están simplemente insertadas en la bicapa lipídica, están unidas a la membrana mediante interacciones no-covalentes con proteínas integrales o con regiones de la bicapa misma. Las proteínas superficiales más grandes, están localizadas en el lado citoplasmático de la membrana y se conocen la espectrina (bandas 1 y 2), la ankrina (bandas 2.1, 2.3, 2.6), la banda 3, la banda 4.1 y 4.2, la actina (banda 5) y la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (banda 6) como puede observarse en la figura 3.

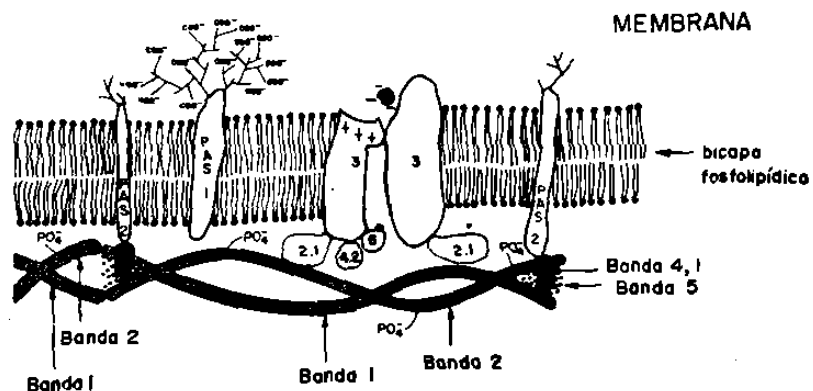


Fig. 3 Representación esquemática de la ubicación y orientación de algunas proteínas de membrana de eritrocito humano. Los números representan a los nombres de las proteínas según la nomenclatura convencional.

e).- Alteraciones de Proteínas Membranales de Eritrocitos en algunas miopatías.

Appel y Roses (1976) estudiaron las membranas de eritrocitos de pacientes con miotonía distrófica, observando una disminución en la fosforilación de la proteína de la banda III, la cual está constituida por varios polipéptidos y relacionada con el canal aniónico y la ATP-asa (Na^+ , K^+). Mediante microscopía electrónica encontraron eritrocitos en forma de copa (estomatocitos) en mayor número que en los individuos normales.

Atkinson y col.(1980) estudiaron eritrocitos de pacientes con distrofia muscular miotónica y de cabras con miotonía hereditaria como modelo animal. En éstas últimas observaron una composición alterada de las membranas con reducción de un polipéptido de peso molecular de 140 000 daltones, por lo que se piensa que el síndrome muscular miotónico puede ser una manifestación de un defecto de membrana generalizado.

MATERIALES Y METODOS

a).- Material Biológico.

El material biológico consistió en ratas macho Rattus norvegicus de la línea Sprague Dawley de 40 días de nacidas, del bioterio de la Unidad de Investigaciones del Noreste. Fueron alimentadas ad libitum con croquetas (Nutricubos) de la marca Anderson Clayton. Se dividieron en tres grupos de cinco animales cada uno.

b).- Equipo.

- 1.- Agitador magnético Thermolyne tipo 1000.
- 2.- Balanza analítica Chyo Júpiter modelo C 3-200.
- 3.- Balanza granataria Ohaus Slale corp. 1201.
- 4.- Cámara de electroforesis modelo Studier (1953).
- 5.- Centrifuga Damon/IEC B-20 A (refrigerada).
- 6.- Centrifuga Sorvall GLC-1.
- 7.- Centrifuga Solbat mod. H-07.
- 8.- Densitómetro Beckman Modelo R-110.
- 9.- Equipo de disección y vidriería común de laboratorio.
- 10.- Espectofotómetro Carl Zeiss. Mod. PM Q III.
- 11.- Espectofotómetro Coleman Jr. II modelo 6/35.
- 12.- Fuente de poder Camag.
- 13.- Homogeneizador Potter-Elvehjem (capacidad 3 ml).
- 14.- Potenciómetro Beckman Century SS-1.
- 15.- Refrigerador (congelador) Revco de -70°C .
- 16.- Rotor 11-79 para la ultracentrifuga.
- 17.- Vortex Thermolyne M-16715.

c).- Origen Comercial de los Reactivos.

BioRad: Azul brillante de comassie R-250.

Azul de bromofenol.

Copper Phedical Inc: Suero control IQ-Pak I.

Elaborado en el IMSS: Reactivo de Biuret.

Imperial Chemical Industries PLC: Clofibrato (ATROMID-S).

Lab. Pisa Guadalajara Jal. Mexico: Cloruro de sodio 0.9%.

Merck: Acido acético(30370 N), ácido sulfúrico (3037-N).

anhidrido acético, carbonato de sodio anhidro,
metanol(401390), glicerol.

Ortho Diagnostic System: Acuglobin.

Productos químicos Monterrey: Urea (7850), ácido tricloro
acético (TCA).

Pro Lab de Jalisco S.A. Solución Drabkin (HICEL).

Química Scott, S.A.:Tartato de sodio y potasio.

Riker S.A. de C.V.: Heparina.

Sigma Chemical Company : Acrilamida (A-8887), albúmina de
suero bovina, bis-acrilamida (N-N'- metilen bis-
acrilamida M-7256), beta mercaptoetanol, glicina
ortotoluidina, persulfato de amonio (A-6712),
TEMED N-N-N'-Tetrametilendiamina (Eastman 8178),
Tris (Tris-hidroximetil amino metano T-1503),
reactivo de fenol (Folin-Ciocalteu's 21-F 5055),
Tiourea, DSS (Dodecil lauril sulfato de sodio).

Smith Kline French S.A.:Anestesal (Pentobarbital sódico).

Técnica Química S.A.: Hidróxido de sodio (3690), sulfa-
to de sodio pentahidratado (S-1190), fosfato de
sodio dibásico (1360).

d).- Preparación de las Soluciones de Fármacos.

1.- Clofibrato: Aforar el contenido de una cápsula de clofibrato, la cual contiene 0.3 ml (500 mg) en 0.45 ml de propilenglicol y agitar vigorosamente.

2.- 20,25-Diazacolesterol: Disolver 50 mg de la droga en un ml de agua bidestilada.

e).- Preparaciones Experimentales.

Al primer grupo de ratas se les administró el clofibrato a una dosis oral y diaria de 300 mg.kg^{-1} de peso por medio de una cánula esofágica utilizando como vehículo propilenglicol.

Al segundo grupo de ratas se les administró 20,25-D a una dosis oral y diaria de 50 mg.kg^{-1} de peso con el mismo procedimiento que el anterior, solo que el vehículo utilizado fue agua.

Al tercer grupo se le mantuvo como control y solamente se les administró propilenglicol.(0.32 ml).

Las ratas fueron pesadas diariamente con la finalidad de proporcionar la dosis exacta de la droga. A los 40 días de iniciado el experimento fueron sacrificadas.

Antes de ser sacrificadas fueron mantenidas en ayuno por 16 horas; posteriormente se les anestesió por vía intraperitoneal con una dosis de 50 mg.kg^{-1} de pentobarbital sódico (Anestosal). Se extrajo sangre por punción cardiaca y se colocó una parte en tubos de ensaye de 13 por 100 mm. con anticoagulante y otra en tubos sin anti coagulante.

Las muestras sin anticoagulante se centrifugaron a 2 500 rpm. Se extrajo el suero cuidadosamente con una pipeta Pasteur y se dividió en dos porciones, una de las cuales se utilizó de inmediato para la determinación de glucosa por el método de la ortotoluidina (Dubowsky, 1962).

La otra porción se mantuvo en congelación a -20°C hasta que se utilizó para las siguientes determinaciones: colesterol por el método de Zlatkis y col. (1953), proteínas séricas totales por el método de Biuret modificado (Reinhold, 1953).

f).- Aislamiento de las Membranas de Eritrocitos.

(Atkinson y col., 1980)

Las muestras con anticoagulante se utilizaron para obtener fantasmas de eritrocitos (membranas). Las muestras se mantuvieron a 4°C , se les centrifugó a 2 500 rpm. con la finalidad de separar el plasma del paquete celular. Con una pipeta Pasteur se extrajo cuidadosamente el plasma. El paquete celular se lavó con una solución de cloruro de sodio (0.15 M) a pH 7.4. Este procedimiento se repitió de tres a cuatro veces; cuidadosamente se eliminó una capa blancuzca que se forma sobre el paquete celular, con el propósito de eliminar glóbulos blancos. Posteriormente se colocaron de uno a dos ml del paquete celular lavado en tubos (capacidad de 50 ml) para ultracentrifuga y se resuspendió en cloruro de sodio (0.036 M) hasta alcanzar un volumen de 30 ml a un pH de 7.4, esto es necesario para hemolizar los glóbulos rojos. Las muestras se agitaron vigorosamente en un Vortex y se centrifugaron a 12 000 rpm. a 4°C por una hora. El sobrenadante se eliminó y de nuevo se resuspendió. Este procedimiento se llevó a cabo varias veces hasta obtener un paquete

cremoso, que indica una contaminación mínima de hemoglobina. De estas muestras se hicieron frotis y se observaron en microscopio de contraste de fases (Fig. 4).

Las proteínas totales de las muestras se cuantificaron por el método de Lowry y col. (1951) utilizando albúmina como estándar.

Además se homogeneizaron con Potter Elvejem y se almacenaron a -70°C hasta su utilización.

Otra porción de las muestras que contenía anticoagulante se utilizó inmediatamente para determinar: Hemoglobina por el método de la Cianometahemoglobina (Hainline, 1958) y hematocrito por el método de microhematocrito (Lynch y col. 1972).

El diagrama de flujo general de la metodología se resume en la figura 5.

g).- Preparación de las Soluciones para la Electroforesis.

1.- Amortiguador Tris a pH 6.8

Sustancia	Concentración	Cantidad
Tris	0.5 M	6.065 g
DSS	0.4 %	2 ml al 20%

Se ajusta el pH con ácido o base según sea necesario y se afora a 100 ml con agua bidestilada.

2.- Amortiguador Tris a pH 8.8

Sustancia	Concentración	Cantidad
Tris	1.5 M	18.165 g
DSS	0.4 %	2 ml al 20%

Se ajusta el pH con ácido o base según sea necesario y se afora a 100 ml con agua bidestilada.

3.- Amortiguador de cámara.

Sustancia	Cantidad
Glicina	144.1 g
Tris	32.0 g

Disolver en 600 ml con agua destilada y aforar a 1 200 con agua bidestilada.

4.- Amortiguador de muestras.

Sustancia	Cantidad
Azul de bromofenol	0.01 g
B-mercaptoetanol	0.5 ml
DSS	0.2 g
Glicerol	1.0 ml
Tris	0.057 g

Disolver y aforar a 3.5 ml con agua bidestilada.

5.- TEMED (N-N-N'N'-tetrametilendiamina)

Se aplican 15 μ l de TEMED puro a 20 ml del gel.

6.- Persulfato de amonio.

Se pesan 0.125 g y se disuelven en un ml de agua bi-distilada (200 μ l de esta solución a 20 ml del gel).

h).- Preparación del gel.

Gel separador al 8 % para preparar 30 ml .

Estas soluciones se deben preparar al momento de usarse y el orden que se menciona:

Sustancia	Cantidad
1.- Agua bidestilada	12.6 ml
2.- Amortiguador Tris 8.8	7.5 ml
3.- Bis-acrilamida	9.9 ml

La solución anterior se desgasificó por un tiempo de 30 minutos para evitar una rápida polimerización y posteriormente se le agregó:

4.- Persulfato de amonio	300 μ l
5.- TEMED	22.5 μ l

Gel concentrador al 5 % para preparar 5 ml .

Estas soluciones se deben preparar al momento de usarse y en el orden que se menciona:

Sustancia	Cantidad
1.- Agua bidestilada	2.91 ml
2.- Amortiguador Tris pH 6.8	1.25 ml
3.- Bis-acrilamida	0.83 ml

La solución anterior se desgasificó por un tiempo de 30 minutos para evitar una rápida polimerización y posteriormente se le agregó:

4.- Persulfato de amonio	50 μ l
5.- TEMED	5 μ l

i).- Preparación de los Paquetes Cremosos (membranas) para la Aplicación en el Gel.

Los paquetes cremosos (f) de las distintas muestras se resuspendieron en amortiguador de muestras. Se agitaron en un vibrador eléctrico y se sumergieron en agua hirviendo durante 2 minutos.

La concentración de las proteínas fue ajustada a 30 μ g/ μ l mediante la adición de amortiguador de muestras. Posteriormente fueron almacenadas en tubos Eppendorf a -20°C.

El diagrama de flujo para la obtención de membranas para aplicar estas muestras en el gel para la electroforesis se resume en la figura 8.

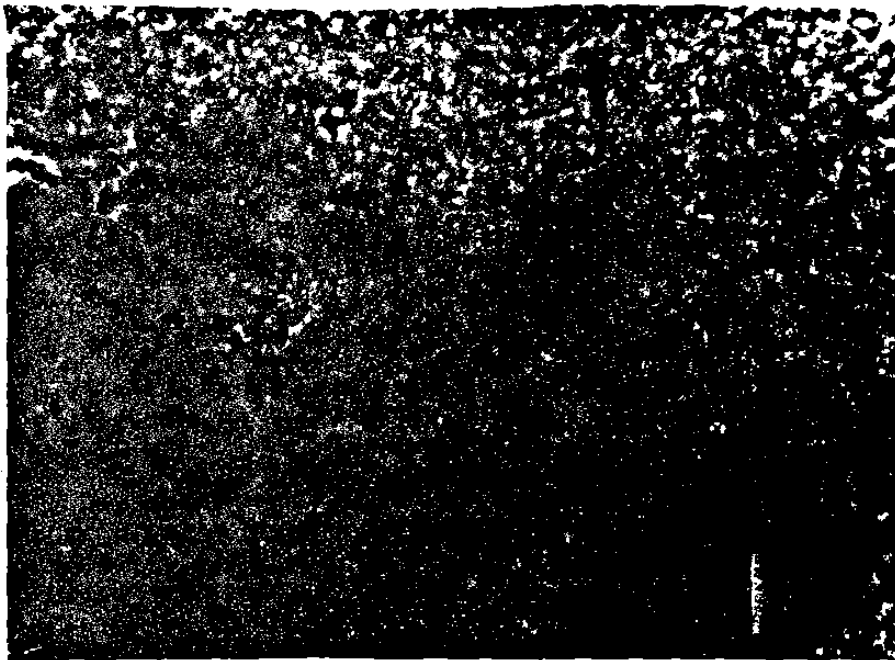


Fig. 4 Muestra del paquete cremoso en el cual se observan vesículas o membranas de eritrocitos ("fantasmas") (10X ; contraste de fases).

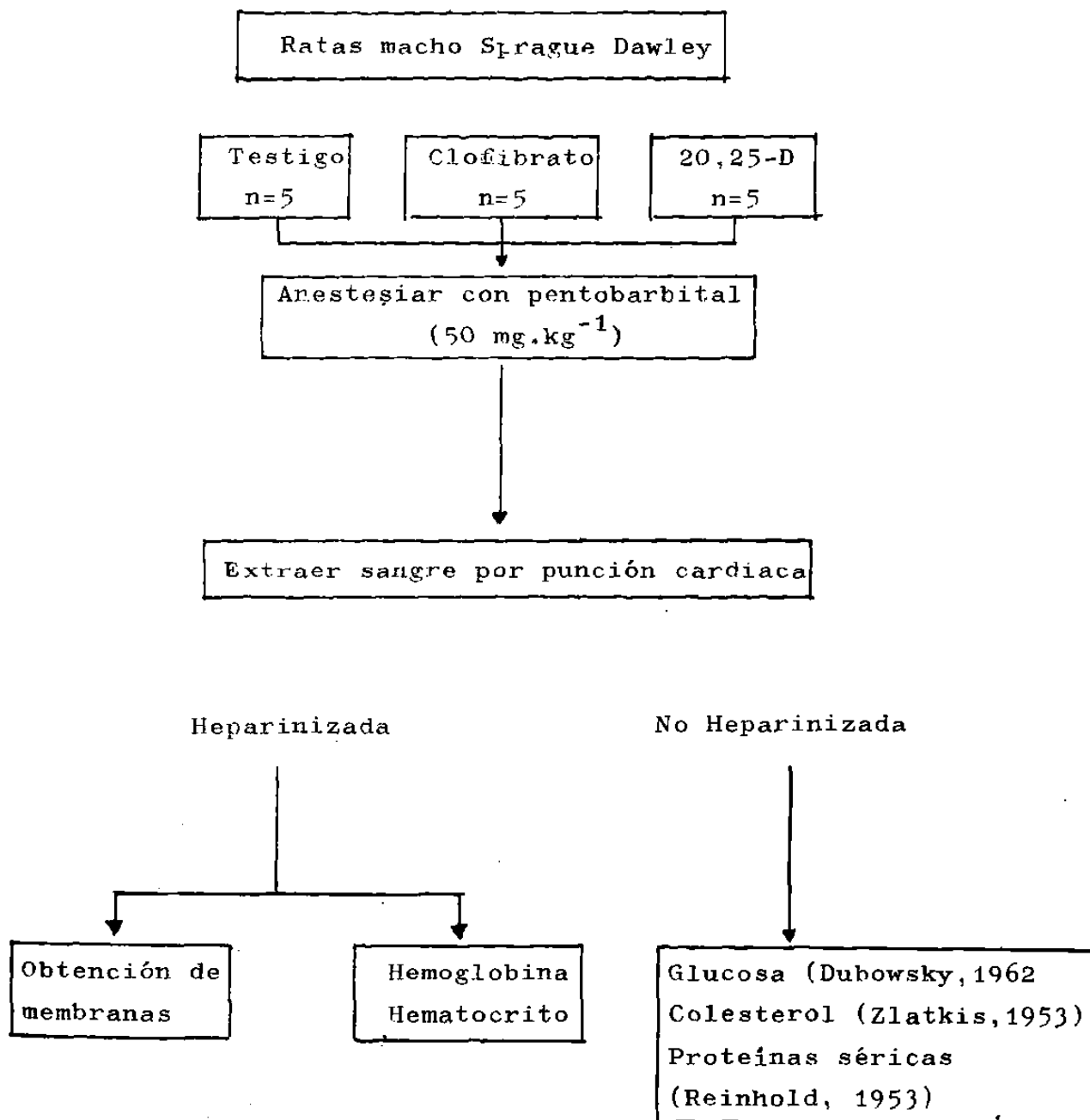


Fig. 5 Diagrama de flujo general.

j).- Colocación de las Placas con el gel en la Cámara para la Electroforesis.(Laemmli, 1970).

El gel es preparado y colocado en una cámara estrecha formada por dos placas de vidrio separadas por un espaciador de acrílico. Los espaciadores son flexibles, un poco más largos que las placas y miden 2.5 cm de ancho y 0.8 mm de grueso.

Las placas de vidrio fueron lavadas y secadas. Los tres espaciadores fueron impregnados de vaselina y puestos como se muestra en la Fig. 6. Las placas se presionaron con clips especiales para evitar el escurrimiento del gel por las orillas.

La solución del gel separador se colocó rápidamente entre las placas de vidrio. El tiempo que tardó en polimerizar fue de 10-15 minutos. Posteriormente en la parte superior se colocó el peine que sirvió de guía para hacer las hendiduras o celdas donde se colocaron las muestras (el peine también fue impregnado con vaselina). Se aplicó cuidadosamente la solución del gel concentrador y se esperó el tiempo necesario para que polimerizara y posteriormente se sacó el peine.

Las placas de vidrio se colocaron en la cámara para electroforesis sosteniéndolas con unas pinzas especiales y se agregó la solución amortiguadora de cámara en la parte superior e inferior de la misma (Fig. 7). Se tomó cuidadosamente el volumen necesario para aplicar 30 μ g de proteína en las celdas formadas. El voltaje inicial utilizado fue de 70 V. Se mantuvo durante ocho horas. La corriente inicial fue aproximadamente de 14 miliamperios y disminuyó durante el proceso hasta aproximadamente cinco miliamperios.

k).- Tinción del Gel.

El gel se sacó cuidadosamente de las placas de vidrio con unos guantes desechables y se colocó en un recipiente que contenía 300 ml de solución fijadora (agua:metanol:ácido acético 50:40:10); se agitó durante 24 horas. Posteriormente se colocó en otro recipiente que contenía solución de azul de coomassie al 0.1 % en solución fijadora por un tiempo de dos horas. Esta solución fué decantada y se agregó de nuevo solución fijadora. El recipiente fue puesto en agitación por 30 minutos con la finalidad de decolorar el gel. Este procedimiento se llevó a cabo varias veces hasta que se visualizaron las bandas.

El diagrama de flujo para la elaboración de la electroforesis se resume en la figura 9.

l).- Metodos Estadísticos.

Para comparar los tres tratamientos utilizados en función de las pruebas biométricas analizadas, se utilizó un análisis de varianza no paramétrica (ANOVA) de Kruskal-Wallis y cuando se encontró diferencia significativa en los límites de los tratamientos, se utilizó el método de Newman-Keulls para comparación de rangos (Zar, 1974).

m).- Densitometría.

Se llevó a cabo en el Densitómetro Beckman, modelo R-110, a una longitud de onda de 520 nanómetros. Con los negativos de los geles previamente fotografiados.

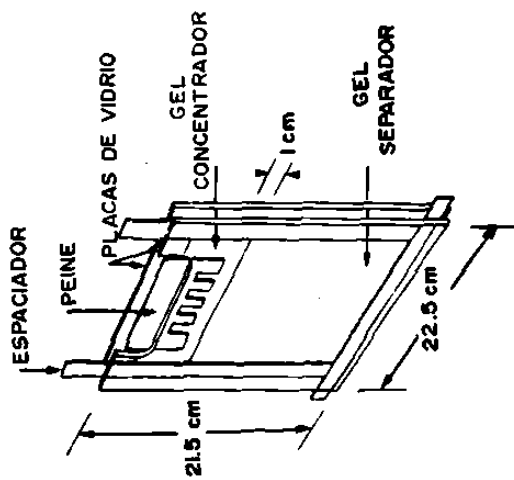


Fig. 6. Construcción de la pieza de gel mostrando las placas de vidrio, separadores y el peine.

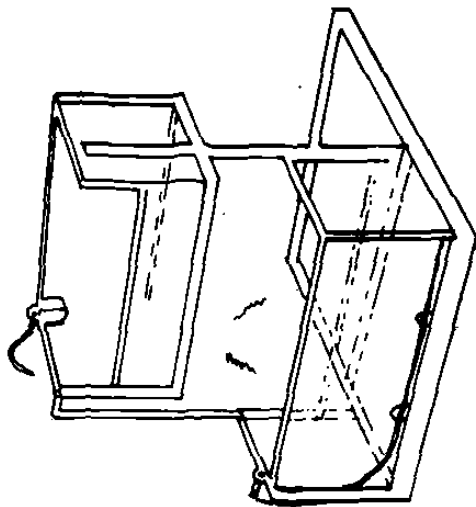


Fig. 7. Cámara para la electroforesis (Studier, 1973).

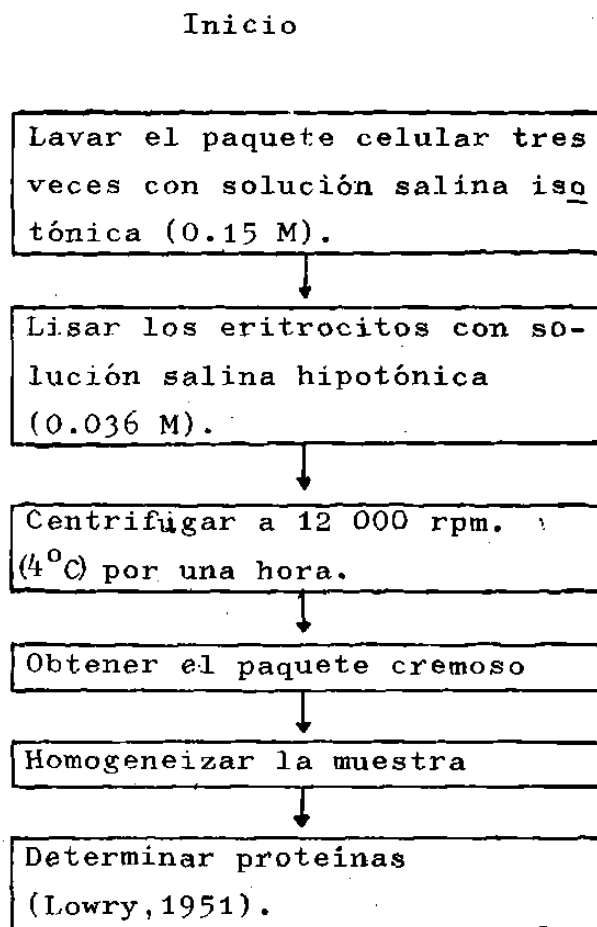


Fig. 8 Diagrama de flujo para la obtención de membranas.

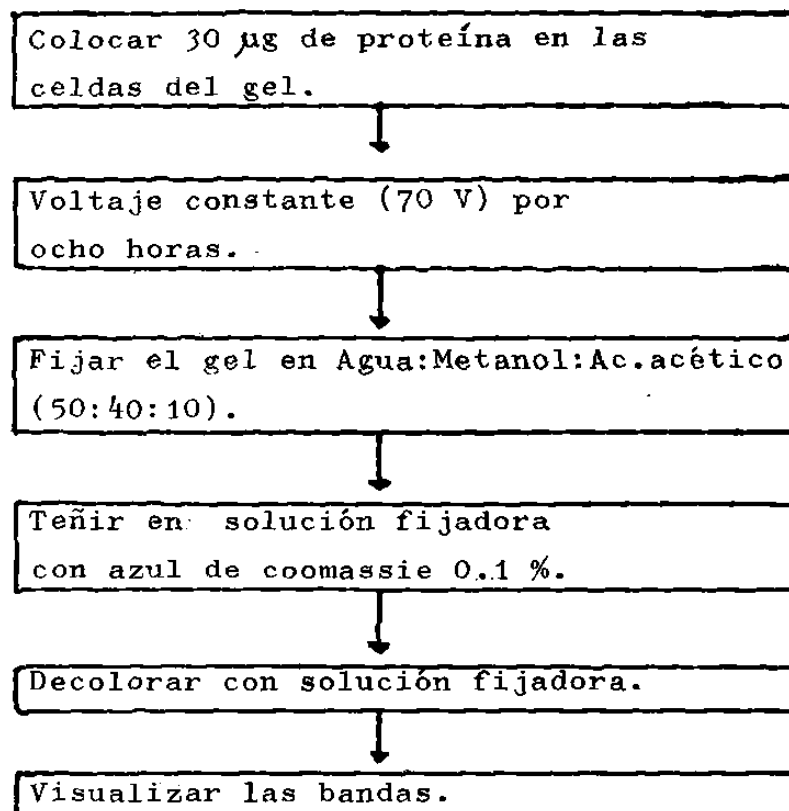


Fig. 9 Electroforesis en gel discontinuo de DSS poliacrilamida (Laemmli, 1970).

R E S U L T A D O S

a).- Electroforesis en Geles en Placa con Poliacrilamida.

Las electroforesis se llevaron a cabo de las muestras obtenidas de cada una de las ratas utilizadas en el presente estudio. Se pone de manifiesto que los resultados son reproducibles bajo las condiciones utilizadas en este trabajo.

La figura 10 muestra el perfil proteico esquemático de membranas de eritrocitos humanos, en el cual se indica la identidad de las principales bandas con sus pesos moleculares, que sirvió para comparar los perfiles proteicos de las ratas testigo y con tratamiento.

La figura 11 muestra el perfil proteico esquemático de las membranas de eritrocitos de humano comparado con el perfil proteico esquemático de una rata normal con sus pesos moleculares aparentes, mostrando las pocas diferencias existentes (indicado con flechas). El perfil proteico de rata tiene más bandas que el perfil proteico de humano, una de las cuales varía entre 47 000 y 78 000 daltones de peso molecular aproximado. Además, se observan dos bandas más que tienen un peso molecular aproximado entre 23 000 y 35 000 daltones, lo cual nos llevó a la posibilidad de hacer una comparación entre éstos.

La figura 12 muestra el perfil proteico de una rata testigo (A) en cual es comparado con el perfil proteico de ratas a las que se les administró clofibrato (B) y 20,25-diazacolesterol (C). Aquí se observa que con el tratamiento con clofibrato hubo un ligero aumento en una banda con peso molecular aparente de 220 000

daltones; además, una disminución de una banda con peso molecular de 200 000 daltones, que si se compara con el perfil proteico de humano parece corresponder a la banda llamada ankrina (bandas 2.1, .2.3, 2.6). Se observó también la disminución de una banda con peso molecular aproximado de 78 000 daltones, que correspondería a la banda 4.1. Por último la disminución de una banda con un peso molecular aproximado de 35 000 daltones y parece corresponder a la banda 6. Los cambios observados en las muestras obtenidas de ratas a las que se les administró clofibrato se indican con una flecha.

El perfil proteico de animales tratados con 20,25-D (C) se observa que no mostró cambio alguno, en relación al testigo.

Cada perfil proteico está representado además por el esquema correspondiente con el fin de observar las diferencias de cada uno. Además, los marcadores de peso molecular utilizados: hemoglobina (15 000), tripsina (23 300) y ovoalbúmina (45 000 daltones).

La figura 13 muestra la densitometría de los geles en DSS-poliacrilamida de membranas de eritrocitos, obtenidas de ratas testigo (A), tratadas con clofibrato (B) y tratadas con 20,25-D (C). Las flechas indican los cambios observados en ratas tratadas con clofibrato (B), en las bandas de pesos moleculares de 200 000, 78 000 y 35 000 daltones. Las variaciones entre una rata testigo y una tratada con clofibrato son muy evidentes y se discutirán posteriormente.

Las fotografías de la figura 12. y 13 son resultados de una muestra típica

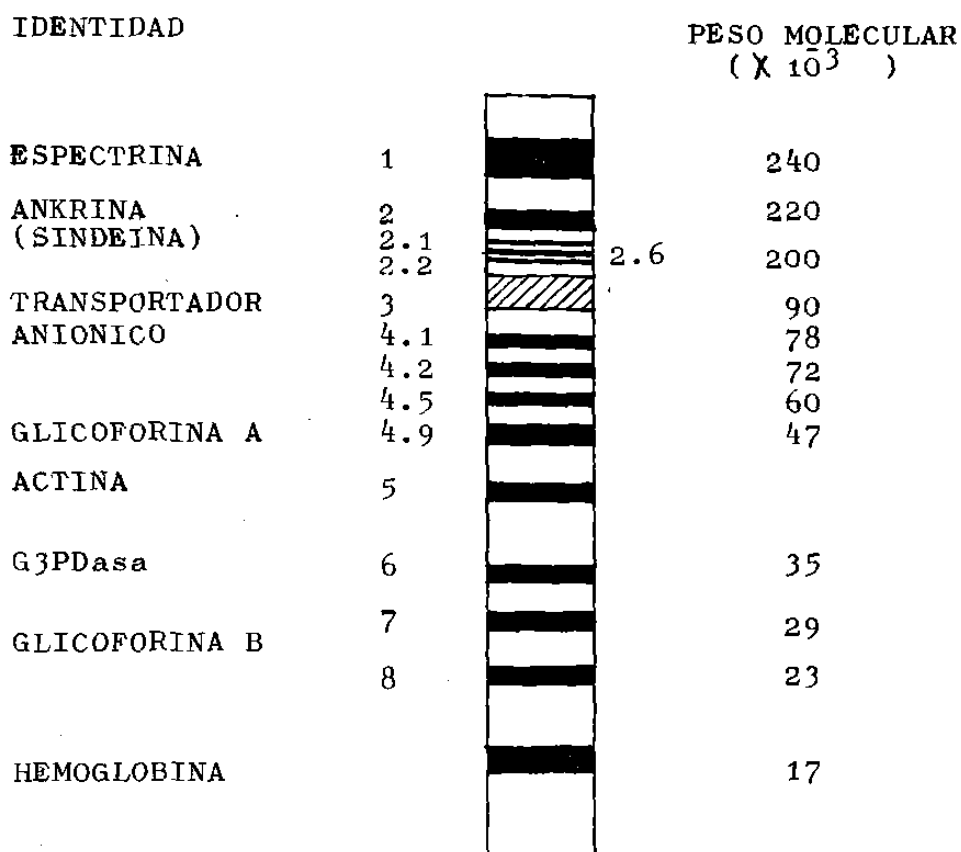


Fig.10 Fotografía esquemática de las principales bandas del perfil proteico de membranas de eritrocitos humanos (Goodman & Schiffer, 1983).

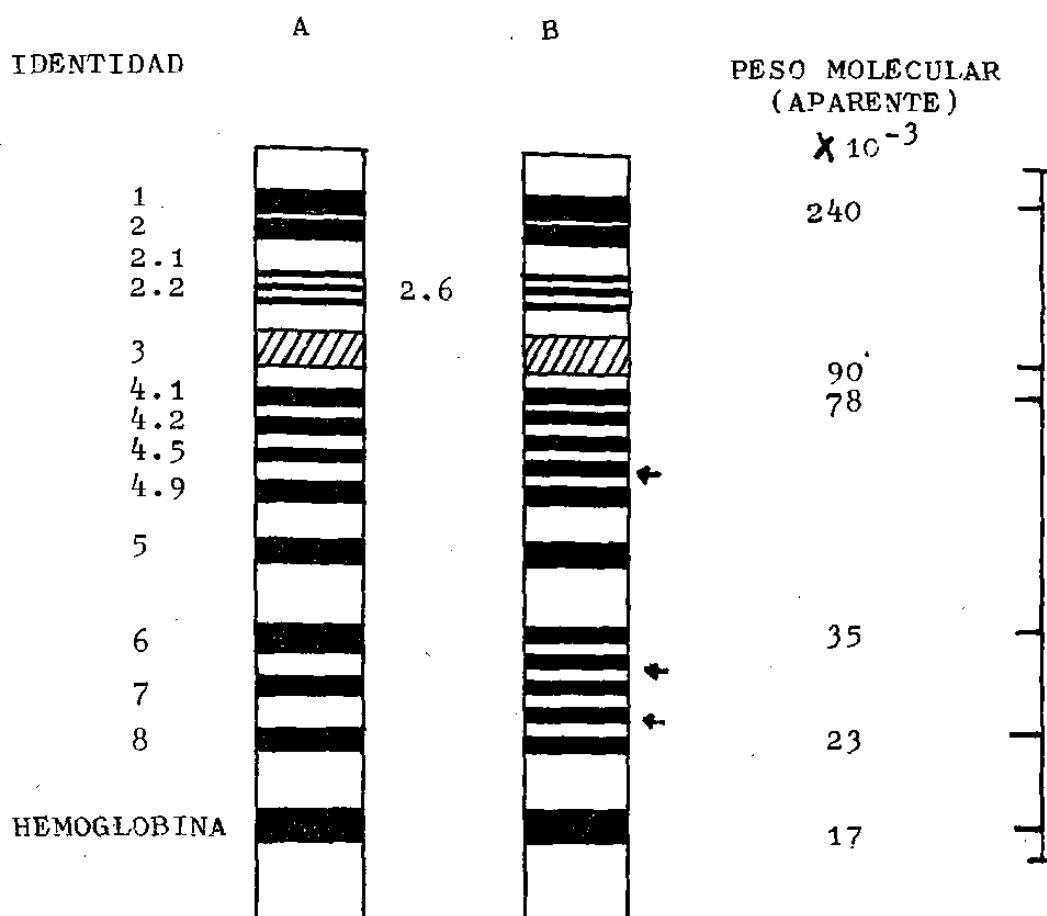


Fig. 11 Perfil proteico esquemático de humano (A) comparado con un perfil de rata normal (B)

IDENTIDAD

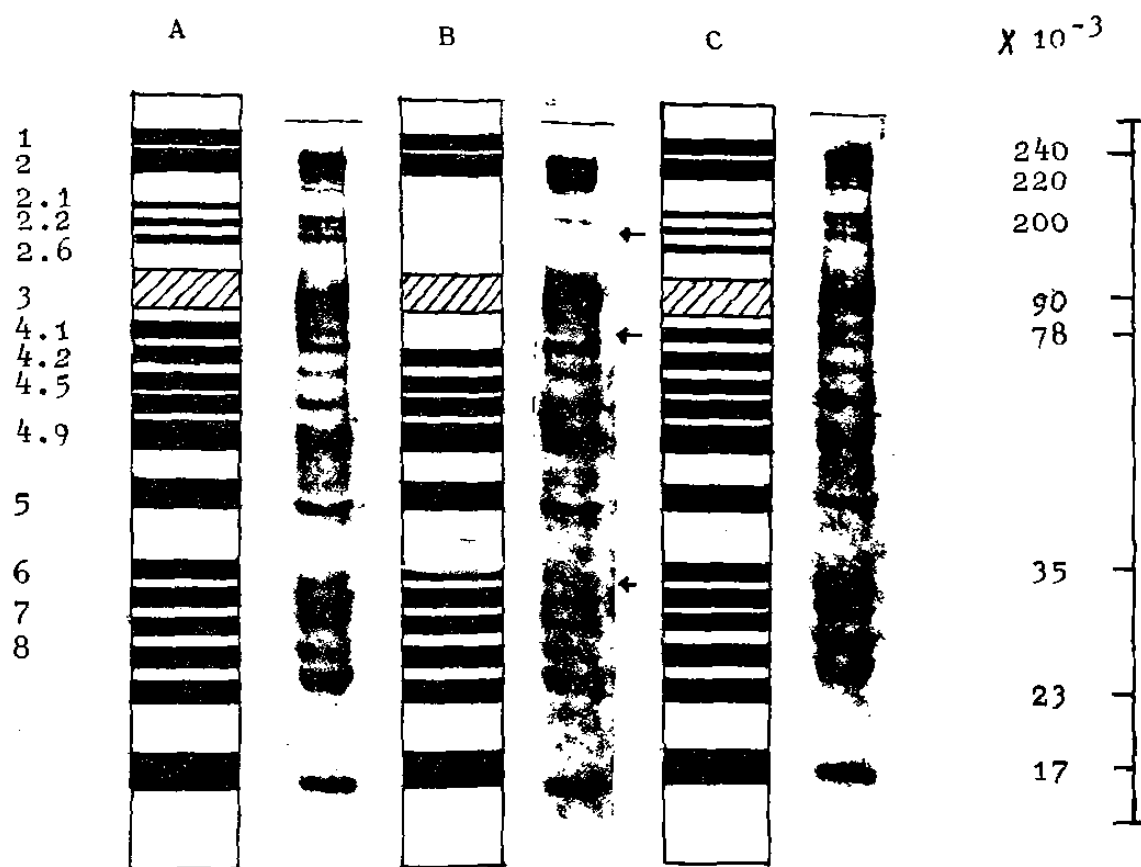
PESO MOLECULAR
(APARENTE)

Fig. 12. Perfil proteico de una rata testigo (A), tratada con clofibrato (B) y 20,25-D(C), con su perfil proteico esquemático correspondiente.

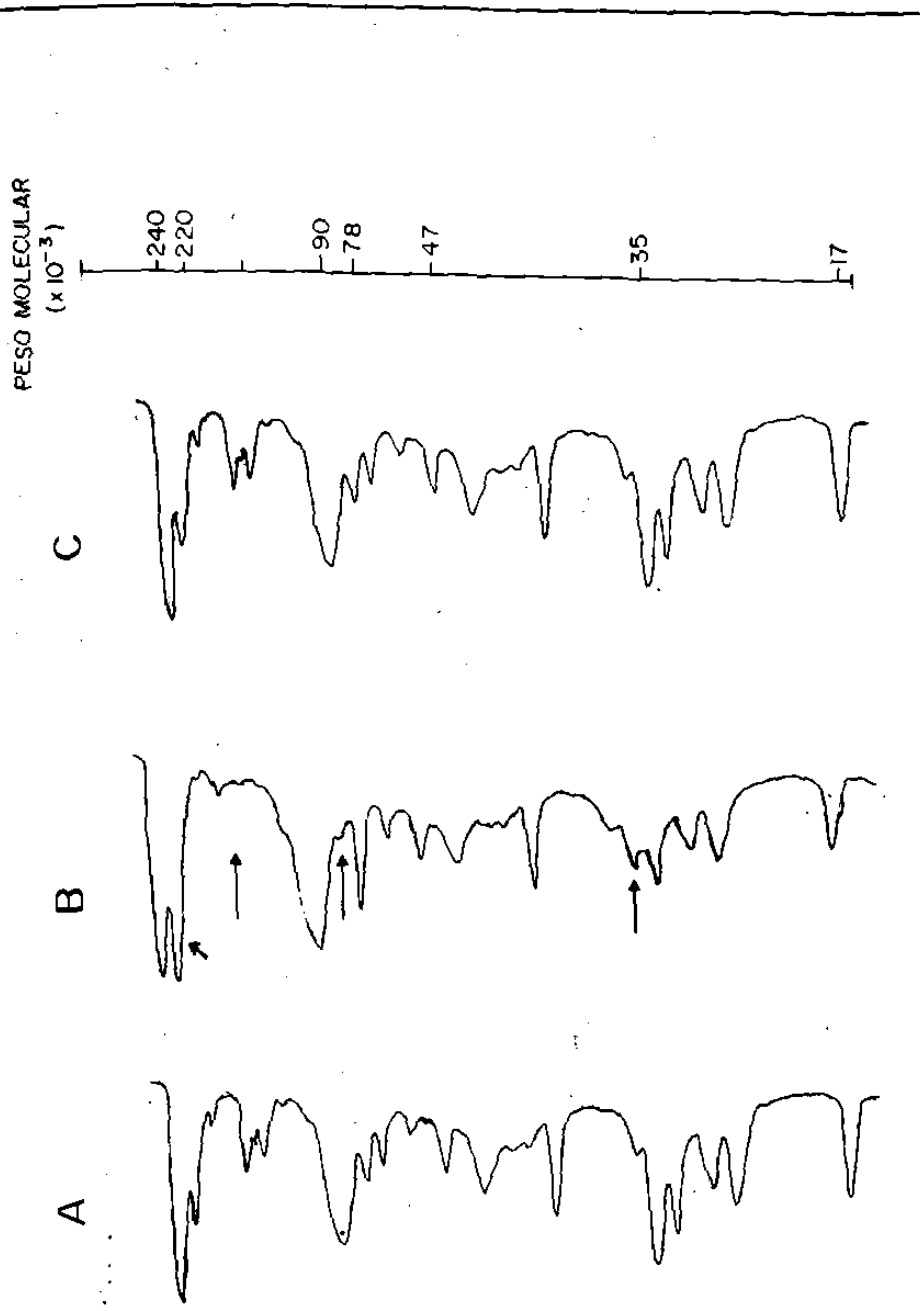


Fig. 13 Densitometría de los geles en DSS-poliacrilamida de membranas de eritrocitos, obtenidas de ratas testigo (A), tratadas con clofibrato (B) y tratadas con 20,25-D (C). Las flechas indican los cambios observados en relación al testigo.

b).- Pruebas Hematológicas.

1.- Hemoglobina.

Los resultados de las determinaciones de hemoglobina en sangre de las ratas que recibieron los diferentes tratamientos se indican en el cuadro 1.

Puede observarse que en las ratas tratadas con clofibrato se presentó mayor dispersión con límites de 14.2 a 22.3 g.dl⁻¹ y en las de 20,25-D la dispersión fue mínima del 11.5 a 12.8 g.dl⁻¹. Cuando estos resultados se compararon con los del testigo y entre ellos se encontró que el 20,25-D disminuyó significativamente con $p < 0.05$. Sin embargo, el análisis estadístico indicó que no hubo diferencias significativas entre las ratas tratadas con clofibrato y el testigo.

2.- Hematocrito.

Los valores del hematocrito de las ratas testigos y tratadas se señalan en el cuadro 2.

Puede observarse que en las ratas tratadas con clofibrato mostraron una dispersión de 44 a 51 (%) y en el 20,25-D fue de 40 a 42 al igual que en la hemoglobina; cuando estos resultados se compararon con los del testigo, entre ellos se encontró que el 20,25-D fue estadísticamente diferente con $p < 0.05$, observando una disminución en este último. El análisis estadístico indicó que no hubo diferencias significativas entre las ratas tratadas con clofibrato y el testigo.

c).- Pruebas Bioquímicas.

1.- Proteínas séricas totales.

Los niveles de proteínas séricas totales correspondientes a las ratas que recibieron los diferentes tratamientos se indican en el Cuadro 3.

La dispersión de ratas tratadas con clofibrato fue de 5.48 a 6.69 g.dl⁻¹, mientras que con el 20,25-D fue de 5.91 a 6.12 g.dl⁻¹. Comparando los resultados de los dos tratamientos con el testigo se observó que las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas.

2.- Colesterol.

En el cuadro 4 se indican los niveles de colesterol que presentaron las ratas expuestas a los diferentes tratamientos. La concentración de colesterol disminuyó significativamente en los dos tratamientos.

Puede observarse poca dispersión en las ratas tratadas con clofibrato que fué de 39.42 a 52.20 mg.dl⁻¹, mientras que con el 20,25-D fué de 40.74 a 47.90 mg.dl⁻¹.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas con $p < 0.05$ cuando fué comparado el testigo con los dos tratamientos utilizados.

3.- Glucosa.

Los niveles de glucosa de las ratas testigo y las tratadas se presentan en el cuadro 5. Los resultados indican que en las ratas tratadas con clofibrato hubo una dispersión que fué desde los límites de 112.29 a 226.36 mg.dl⁻¹, mientras que para los animales tratados con

20,25-diazacolesterol la dispersión fue desde 75.5 a 164.23 mg.dl⁻¹. Sin embargo en los testigos fue mínima, de las diferencias observadas entre los dos tratamientos y de éstos con el grupo testigo, éstas no fueron significativas cuando se sometieron a las pruebas estadísticas.

CUADRO # 1

Análisis de varianza (no paramétrica) de la concentración de hemoglobina (g.dl^{-1}). Método de Kruskal-Wallis.

TESTIGO	CLOFIBRATO	20,25-D
13.5	14.2	11.5
14.8	14.2	11.5
15.0	19.6	12.4
16.0	21.0	12.5
17.2	22.3	12.8

$$R_T = 46$$

$$R_C = 57$$

$$R_{20,25} = 15$$

$$H_c = 7.9283 ; \text{ gl} = 2 ; p < 0.05$$

Comparación de rangos por el método de Newman Keuls

$$R_T = R_C$$

$$R_T \neq R_{20,25}$$

$$R_C \neq R_{20,25}$$

CUADRO # 2

Análisis de varianza (no paramétrica) del hemato-
crito (%). Método de Kruskal-Wallis.

TESTIGO	CLOFIBRATO	20,25-D
47	44	40
47	45	40
47	46	40
47	47	42
51	51	42

$$R_T = 58.5 \quad R_C = 46.5 \quad R_{20,25} = 15$$

$$H_c = 10.58 \quad ; \quad g_1 = 2 \quad ; \quad p < 0.05$$

Comparación de rangos por el método de Newman-Keulls

$$R_T = R_C$$

$$R_T \neq R_{20,25}$$

$$R_C \neq R_{20,25}$$

CUADRO # 3

Análisis de varianza (no paramétrica) de la concentración de proteínas séricas totales (g.dl^{-1}). Método de Kruskal-Wallis.

TESTIGO	CLOFIBRATO	20,25-D
5.16	5.48	5.91
5.27	6.16	5.16
5.27	6.16	6.00
6.00	6.16	6.00
6.12	6.39	6.12

$$R_T = 26$$

$$R_C = 58$$

$$R_{20,25} = 36$$

$$H_c = 5.40 \quad ; \quad g_1 = 2 \quad ; \quad p > 0.05$$

CUADRO # 4

Análisis de varianza (no paramétrica) de la concentración de colesterol (mg.dl^{-1}). Método de Kruskal-Wallis.

TESTIGO	CLOFIBRATO	20,25-D
63.94	39.42	40.74
66.80	40.74	44.00
73.76	46.00	44.20
75.10	52.57	47.20
75.55	55.20	47.90

$$R_T = 65$$

$$R_C = 28$$

$$R_{20,25} = 27$$

$$H_c = 9.55$$

;

$$g_l = 2$$

;

$$p < 0.05$$

Comparación de rangos por el método de Newman-Keulls

$$R_T \neq R_C$$

$$R_T \neq R_{20,25}$$

$$R_C = R_{20,25}$$

CUADRO # 5

Análisis de varianza (no paramétrica) de la concentración de glucosa (mg.dl^{-1}). Método de Kruskal-Wallis.

TESTIGO	CLOFIBRATO	20,25-D
156.16	112.29	75.51
160.19	149.09	111.78
164.23	160.13	125.90
168.23	178.52	135.99
180.16	226.36	164.23

$$R_T = 42.5 \quad R_C = 22.5 \quad R_{20,25} = 45$$

$$H_c = 4.63 \quad ; \quad g_l = 2 \quad ; \quad p > 0.05$$

DISCUSION Y CONCLUSIONES

a). Electroforesis en Geles en Placa con Poliacrilamida.

Como se mencionó anteriormente, la miotonía puede manifestarse como un defecto de membrana generalizado, es decir, que además de estar alterada la membrana muscular también puede alterarse otro tipo de membrana en una miotonía natural.

En el presente estudio se trata de establecer una relación entre el perfil proteico de membrana de eritrocitos y la miotonía inducida farmacológicamente.

El perfil proteico de membranas de eritrocitos de ratas tratadas con clofibrato mostró el aumento de una banda con peso molecular aparente de 220 000 que parece corresponder a la banda 2, además la disminución de una banda con peso molecular aparente de 200 000 daltones, que si se compara con el perfil proteico de eritrocitos de humano parece corresponder a la banda llamada ankriⁿa (bandas 2.1, 2.2, 2.6). Esta proteína también llamada sindeína se une a la espectrina en la superficie interna de la membrana, también se ha observado que puede asociarse con el dominio citoplasmático de la banda 3, la cual tiene como principal función el transporte aniónico principalmente de cloruro y bicarbonatos.

Por otro lado, se observó también la disminución de una banda con peso molecular aproximado de 78 000 daltones, esta banda parece corresponder a la banda 4.1 la cual se ha demostrado que se une fuertemente a la espectrina y de esta forma actúa reforzando la interacción de espectrina-actina; es una proteína globular y probable-

mente se une a la membrana lipídica y a la glicoforina.

Por último se observó la disminución de la banda con un peso molecular aparente de 35 000 daltones, la cual parece corresponder a la banda 6 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). Este polipéptido se ha localizado cerca de la banda 3, preferencialmente en la superficie citoplasmática de ésta.

Es posible que el clofibrato al afectar a las proteínas correspondientes a las bandas 2, 2.1, 2.2, 2.6, 4.1 y 6, actúe además, directa o indirectamente, sobre la funcionalidad de la banda 3, ya que hay referencias donde se menciona que la principal causa de la miotonía es una disminución en la conductancia al ion cloruro (Bryant y Morales-Aguilera, 1971). La banda 3 es una proteína integral cuya función, como se ha mencionado anteriormente, es la de transportar cloruro y bicarbonato a través de la membrana (Rothstein, 1976).

No existen antecedentes de los cambios en proteínas de membrana de eritrocitos descritos en este estudio. Sin embargo, Niébroj-Dobosz y Kwieciński (1983) determinaron el perfil proteico de membranas de músculo, obtenidas de ratas a las que se les administró diariamente una dosis de 400 mg.kg^{-1} por 25 días. El estudio electroforético reveló una disminución de las proteínas con un peso molecular de 200 000, 80 000 y 40 000 daltones, que caen en un rango similar al observado en este estudio en eritrocitos.

Para poner en evidencia los cambios observados en el perfil proteico de ratas testigo y tratadas, se llevo cabo una densitometría en un aparato Beckman, modelo R-110 a una longitud de onda de 520 nanómetros en la cual se observan diferencias muy claras.

Cabe mencionar que las electroforesis se llevaron a cabo de las muestras obtenidas de cada una de las ratas utilizadas en el presente estudio. Se pone de manifiesto que los resultados son reproducibles bajo las condiciones utilizadas en este trabajo. Las fotografías de la figura 12 y 13 son resultados de una muestra típica.

Por otro lado, los animales a los que se les administró 20,25-D no mostraron cambio alguno. Se ha observado que en la miotonía inducida por esta droga hay una serie de alteraciones tales como aumento en la fluidez de la membrana de eritrocitos, éste aumento pudiera estar relacionado con la disminución del colesterol inducido por el 20,25-D, pues la importancia del colesterol es mantener la estabilidad mecánica de las membranas. Además del aumento en la fluidez se ha observado aumento y disminución en algunas enzimas, distrofia miotónica, daño al músculo cardíaco, atrofia testicular, cambio en el contenido de esteroides en plasma y membrana de eritrocitos (en donde disminuye el total de esteroles y colesterol, aumentando el desmosterol). La miotonía inducida por el 20,25-D es poco intensa y según algunos autores (Chalikian y Barchi, 1982) no va acompañada por una disminución importante en la conductancia al ion cloruro. Esto hace pensar que la miotonía inducida por esta droga es consecutiva a alteraciones generales de la estructura de la membrana y no tan específica como la que puede producir el clofibrato. Se ha descrito por otros autores que las alteraciones pueden atribuirse a modificaciones en la estructura lipídica de la membrana, ya que el 20,25-D altera significativamente los niveles de colesterol, el cual está importantemente asociado a la estructura de la membrana, se desconoce la función del colesterol, pero se sabe que mantiene la estabilidad mecá

nica de la membrana y que está directamente involucrada en la fluidez de la misma, como el 20,25-D es un análogo del colesterol esta droga podría actuar con más eficacia en la membrana lipídica alterando su funcionalidad.

No se observaron cambios en nuestro estudio en las proteínas determinadas por electroforesis, esto sugiere que las alteraciones membranales inducidas por el 20,25-D deben atribuirse a modificaciones en la estructura lipídica de la membrana y no a cambios proteicos cuantitativos detectados mediante esta técnica.

b).- Pruebas Hematológicas.

No se observaron diferencias significativas con los testigos en las muestras de sangre obtenidas de ratas tratadas con clofibrato, lo que indica que esta droga no altera la hemoglobina ni el hematocrito de los animales tratados con ella. En cambio, los animales tratados con 20,25-diazacolesterol presentaron una disminución significativa de la hemoglobina y del hematocrito. No hay informes previos acerca de estos efectos. Es probable que algunos cambios en la elasticidad de la membrana de los eritrocitos producidos por el 20,25-D, hagan que éstos sean más propensos a la fragmentación con la formación de esquistocitos (fragmentos celulares) Beeson y McDermott (1971). Estas partículas son eliminadas con facilidad por el sistema reticuloendotelial. En ciertas condiciones la mayor parte de la eritrofagocitosis parece tener lugar en la médula ósea. En estados patológicos en que el eritrocito esté afectado y su supervivencia sea más corta de lo normal, el sitio de destrucción dependerá del tipo de daño: si éste no es de mucha importancia los eritrocitos serán eliminados por el bazo y si el daño es muy grande las células serán eliminadas por el hígado. (Davidsohn, 1974).

Una menor supervivencia de los eritrocitos puede deberse a trastornos congénitos o hereditarios de la membrana o a factores extrínsecos, dentro de los cuales se encuentran los fármacos. Por esta razón, especulamos que la causa de la disminución de la concentración de hemoglobina y del hematocrito producidas por el 20,25-D sea semejante (Beeson y McDermott, 1979).

Por otro lado, diversos investigadores tales como Butterfield y col. (1976), Butterfield y Watson (1977), Kuhn y col. (1968), Peter y col. (1975), demostraron en ratas que con la administración del 20,25-D se altera la membrana de los eritrocitos al aumentar la fluidez. Este fenómeno observado también por Butterfield y col. (1976) en pacientes con miotonia distrófica. La posible explicación de esta alteración en dichos pacientes, es que las diferencias de la fluidez entre varios tipos celulares se deban a diferencias en la conducción molecular de su membrana. Estas podrían ser explicadas por las grandes diferencias demostradas en algunas especies moleculares tales como proteínas, lípidos (fosfolípidos, gangliósidos, colesterol, ácidos grasos), carbohidratos (ácido siálico e inositol) (Kuhn y col., 1968). Otra posible explicación es que en las células rojas de los pacientes miotónicos esté alterada la interacción lípido-proteína, lo que podría deberse a alteraciones en las proteínas de membrana o en su organización. Las diferencias en la interacción proteína-lípido y/o proteína-proteína podrían explicar alteraciones en la fluidez de la membrana. Estas alteraciones en la fluidez de la membrana podrían contribuir a una disminución de la vida media del eritrocito como se sugirió antes, razón por la que podría disminuir la concentración de hemoglobina y hematocrito.

Otras posibilidades son: una disminución en la tasa de producción de los eritrocitos o aumento en la destrucción de los mismos, pero no existen antecedentes de que el 20,25-D produzca tales efectos. Sin embargo, se conoce que ciertos productos químicos tales como el benceno, trinitrotolueno, etc., lesionan la médula ósea y pueden alterar la producción de eritrocitos, por lo que

no se descarta la posibilidad de que el fármaco que utilizamos (20,25-D) actúe disminuyendo la producción de eritrocitos y a su vez la concentración de hemoglobina y hematocrito (Beeson y McDermott, 1971).

c).- Pruebas Bioquímicas.

1.- Proteínas séricas totales.

Las proteínas plasmáticas son las que ocupan una posición central en el metabolismo proteico, no sólo por que están presentes en casi todos los tejidos del organismo, sino también porque están íntimamente relacionadas al metabolismo proteico en el hígado. En realidad una gran parte de las proteínas plasmáticas contribuye a las necesidades nitrogenadas, a la defensa del organismo contra las invasiones de microorganismos, a la reparación de lesiones, a mantener el pH y el balance osmótico del organismo y a regular las actividades y funciones celulares (Putnan, 1960). En muchas enfermedades las proteínas del plasma pueden fluctuar como componentes que son de un sistema metabólico dinámico, por lo tanto, se puede obtener mucha información de orden general mediante el estudio y determinación de las proteínas plasmáticas (Davidsohn y col., 1974).

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de proteínas de ratas que se mantuvieron como testigos y los de las ratas a las que se les administró el clofibrato y el 20, 25-D, por lo que se puede decir que estas drogas no afectaron el metabolismo de esas proteínas.

Powanda y col. (1976) realizaron un estudio en el

que administraron clofibrato a ratas macho de la línea Fischer-Dunning, estudiaron algunas variables dentro de las cuales se incluían las proteínas séricas, tampoco encontraron diferencias significativas en relación a los testigos, sin embargo, en este trabajo se observó que no cambian las proteínas séricas totales, pero sí se ve aumentada la fracción proteica de albúmina y disminuida la fracción alfa 2 de las globulinas.

2.- Colesterol.

La mayor parte del colesterol del cuerpo es sintetizado (cerca de 1 g al día), mientras que sólo aproximadamente 0.3 g son suministrados diariamente por la dieta. El colesterol es eliminado por dos vías principales: la conversión a ácidos biliares y la excreción como esteroides neutros en las heces fecales. La síntesis de las hormonas esteroideas a partir de colesterol y la eliminación de sus productos de degradación en la orina, son de significación cuantitativa muy pequeña. Los tejidos que se sabe son capaces de sintetizar colesterol incluyen al hígado, la corteza adrenal, la piel, el intestino, los testículos y la aorta. Las fracciones microsómicas del citosol son responsables de la síntesis del colesterol (Martin D.W. y col., 1984).

Los resultados del presente estudio muestran que la administración crónica del clofibrato y del 20,25-D producen alteraciones metabólicas tales como disminución de los niveles de colesterol en suero.

Aun cuando ambas drogas provocan un síndrome muscular y disminuyen los niveles de colesterol, tienen diferentes formas de acción; con la administración del 20,25-diazacolesterol se acumula desmosterol, pero con la

administración de clofibrato no se observa tal acumulación (Eberstein y Goodgold, 1973).

Avoy y col.(1965) observaron en ratas tratadas con clofibrato una disminución de colesterol hepático hasta de un 30 %, al igual que Powanda y col.(1976) quienes utilizaron 1.25 % de clofibrato en la dieta, lo que equivale aproximadamente a 625 mg.kg^{-1} . Esta concentración de droga hace descender el colesterol hasta el nivel de 17.8 mg.dl^{-1} . En comparación con nuestro experimento, donde se utilizó una dosis de 300 mg.kg^{-1} , el colesterol disminuye hasta el nivel de 46.8 mg.dl^{-1} . Paul y Adibi en 1979 observaron la disminución de colesterol hasta 54 mg.dl^{-1} , utilizando una dosis igual a la que se utilizó en el presente estudio (300 mg.kg^{-1}). Con estos datos se puede afirmar que la disminución en los niveles de colesterol es proporcional a la concentración de clofibrato administrada.

Por otro lado, en las ratas aquí tratadas con 20,25-diazacolesterol se puso en evidencia una disminución de colesterol sérico, al igual que lo que observaron Sommers y Winer (1966) y Kwieciński (1981) quienes además de los cambios de los niveles de colesterol y esterol el plasma, también encontraron modificaciones en membranas de eritrocitos y de músculo. Además, Chalikian y Barchi (1982 a) observaron la acumulación de desmosterol y colesterol en músculo. Burns y col.en 1968, trabajando con cabras a las que se les administró 20,25-D, observaron reducción de colesterol en plasma y eritrocitos. Furman y Barchi (1981) observaron la disminución de colesterol sarcolemal al igual que lo habían informado Peter y col. en 1975.

Los resultados obtenidos en este estudio con 20,25 diazacoesterol y clofibrato sobre el colestero^l sérico confirman los obtenidos por los autores antes mencionados. Ya que el propósito de cuantificar el efecto sobre el colestero^l en este diseño fue el de que esa prueba sirviera como testigo positivo de la metodología se considera que ésta es plenamente confiable.

3.- Glucosa.

En la digestión la mayor parte de los carbohidra-
tos de la dieta forman glucosa y fructosa. Estas son
absorbidas y llevadas por la vena porta al hígado. Ahí
la fructosa es fácilmente convertida en glucosa. El man
tenimiento de los niveles estables de glucosa en la san-
gre es, de todos los mecanismos homeostáticos, uno de
los más finamente regulados y en él participan el hígado,
los tejidos extrahepáticos y varias hormonas. La
glucosa penetra a las células por difusión simple, mien-
tras que las células de los tejidos extrahepáticos son
relativamente impermeables y se requiere de un mecanis-
mo de transporte activo en las membranas para que la
glucosa penetre (Davidshon y col., 1974).

La concentración de la glucosa en la sangre es un
dato importante para determinar la velocidad con la que
tanto el hígado como los tejidos extrahepáticos captan
la glucosa.

Se ha estimado que en la rata la incorporación y
la salida de la glucosa sanguínea es de 500 mg.dl^{-1} (Mar-
tin D.W., 1984).

Hay varios reportes de que dosis altas de clofibra-
to disminuyen la glucemia. Powanda y col. en 1976 obser-
varon una disminución en los niveles sanguíneos de

glucosa en ratas macho Fischer-Dunning, a las cuales se les proporcionó 1.25 % de clofibrato en la dieta (625-mg.kg^{-1}). Wilkening y col. (1978) informaron que esta droga interfiere con el metabolismo de la glucosa en músculo estriado. Por otra parte, Paul y Adibi (1979) no observaron disminución de los niveles sanguíneos de glucosa con una dosis de 300 mg.kg^{-1} de clofibrato. Sus resultados son confirmados por el presente estudio, en el que se utilizan dosis iguales y ratas de la línea (Sprague Dawley) como las de ellos, aunque en su caso so lo administraron la droga durante 14 días.

En pacientes con miotonía natural no se han informado alteraciones en la glucemia, hecho que coincide con el presente modelo experimental. Aparentemente, el clofibrato no afecta el metabolismo de la glucosa en la línea de ratas que se trabajaron a dosis menores de 300 mg.kg^{-1} . Sin embargo, los resultados aquí encontrados, muestran una mayor dispersión de los valores obtenidos en los animales tratados con clofibrato que en los testigos y caen dentro del límite de glucemia considerado como normal, muestran una tendencia a niveles sanguíneos de glucosa menores que los de los testigos. Esto podría explicarse si se acepta que a la dosis de 300 mg.kg^{-1} de clofibrato ya empiezan a manifestarse sus efectos disminuyendo el glucógeno hepático, aumentando su degradación y disminuyendo su síntesis tal como se ha mostrado que ocurre con las dosis mayores (Powanda y col., 1976).

Es posible que causen anormalidades en la membrana del hígado y alteraciones enzimáticas y esto afectaría su capacidad para elaborar suficiente glucosa que trae como consecuencia una hipoglucemia.

Por otro lado, los animales tratados con 20,25-D no presentaron alguna diferencia estadísticamente significativa cuando fueron comparados con los testigos, no se tienen antecedentes de que animales tratados con esta droga modifiquen el metabolismo de la glucosa de acuerdo a los resultados podemos concluir que el 20,25-D no altera las concentraciones de glucosa en suero sanguíneo utilizando una dosis de 50 mg.kg^{-1} . Sin embargo, los cambios que se pudieran encontrar en las ratas tratadas con clofibrato dependen en gran parte de la concentración de la dosis administrada.

CONCLUSIONES GENERALES Y PRESPECTIVAS

- 1.- Los animales tratados con clofibrato y 20,25-D mostraron menos signos evidentes de miotonía que las que producen drogas más potentes como el ácido-9-antracén-carboxílico.
- 2.- El perfil proteico de la membrana de eritrocitos obtenidas de ratas tratadas con clofibrato mostró la disminución de algunas bandas de peso molecular aparente de 220 000, 78 000 y 35 000 daltones, que posiblemente esten directa o indirectamente relacionados con el transportador aniónico.
- 3.- En ratas tratadas con 20,25-D no se observó cambio alguno; no se descarta la posibilidad de que existan cambios conformacionales o funcionales en las proteínas, ya que mediante la técnica de electroforesis no es posible determinar dichos cambios.
- 4.- No se observaron cambios en la hemoglobina, hematocrito, proteínas séricas y glucosa en animales tratados con clofibrato, lo cual indica que aparentemente no se alteran estas variables a las dosis utilizadas en el presente estudio. El colesterol sí disminuyó considerablemente, pues es una droga que actúa disminuyendo las concentraciones de colesterol en suero, hecho que ha sido demostrado también por otros autores.
- 5.- La disminución observada en la hemoglobina y hematocrito de ratas tratadas con 20,25-D. podrían ser consecuencia de alteraciones a nivel de la membrana, que podría dar lugar a una fragmentación de los eritrocitos y ésto a su vez la disminución de las variables antes mencionadas. Además, aparentemente no

modifican el metabolismo de las proteínas séricas y glucosa, sin embargo, la disminución de colesterol fue evidente ya que es una droga hipocolesterolemizante, hecho confirmado también por otros autores.

El presente estudio abre las puertas para investigar alteraciones que no es posible detectar mediante electroforesis, ya que solamente pone en evidencia cambios cualitativos o cuantitativos en el perfil proteico. Se planea determinar la funcionalidad de la banda 3, midiendo la conductancia al ion cloruro, marcándolo radiactivamente, para relacionar los cambios en las proteínas vecinas a la banda 3, con posibles cambios en la conductancia al ion cloruro. Además es posible conocer, si los cambios encontrados en el presente estudio son reversibles, pues se ha demostrado que al eliminar la administración de la droga, los síntomas desaparecen gradualmente. Además, se podrían demostrar alteraciones en la morfología de la membrana de eritrocitos obtenidas de ratas tratadas con drogas mictonizantes, mediante fotografías en barrido. Por último, ya que el clofibrato es una droga utilizada actualmente en pacientes, para disminuir los niveles de colesterol, sería de gran interés conocer si las alteraciones observadas en el presente estudio, también se manifiestan en pacientes a los cuales se administra esta droga.

LISTA DE FIGURAS

1.- Algunas rutas de la biosíntesis del colesterol y los sitios en donde se presume que actúa el clofibrato -----	14
2.- Biosíntesis del colesterol presentando el sitio de acción del 20,25-diazacolesterol. -----	18
3.- Representación esquemática de la ubicación y orientación de algunas proteínas de membrana de eritrocitos de humano -----	22
4.- Muestra del paquete cremoso en el cual se observan vesículas o "fantasmas" de eritrocitos -----	32
5.- Diagrama de flujo general -----	33
6.- Construcción de la pieza del Gel mostrando las placas de vidrio, separadores y el peine -----	36
7.- Cámara para la Electroforesis -----	36
8.- Diagrama de flujo para la obtención de membranas -	37
9.- Electroforesis en gel discontinuo de DSS-poliacrilamida -----	38
10.- Fotografía esquemática de las principales bandas del perfil proteico de membranas de eritrocitos de humano -----	41
11.- Perfil esquemático de humano, comparado con un perfil de rata normal -----	42
12.- Perfil proteico de una rata testigo y los dos tratamientos con su esquema correspondiente -----	43
13.- Densitometría de los perfiles proteicos de membrana de eritrocitos A) Testigo, B) Clofibrato C) 20, 25-diazacolesterol -----	44

LISTA DE ABREVIATURAS

G_{Cl^-}	Conductancia al ion cloruro.
EMG	Electromiografía.
20,25-D	20,25-diazacolesterol.
Cl	Cloro.
Na	Sodio.
K	Potasio.
DSS	Dodecil sulfato de sodio.
Tris	Tris-hidroximetil-amino metano.
TEMED	N-N-N'-N'- tetrametilendiamina.
rpm	Revoluciones por minuto.
C	Clofibrato.
min	Minutos
h	Horas.
$^{\circ}C$	Grados Centigrados.
M	Molar.
ug	micro gramos.
ul	microlitros.
ml	mililitros.
$mg.dl^{-1}$	miligramos por decilitro.
$g.dl^{-1}$	gramos por decilitro.
$mg.kg^{-1}$	miligramos por kilorgamo de peso.
V	Voltios.
$\frac{\circ}{A}$	Amstrong

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adrian R.H., Bryant S.H. 1974. On the repetitive discharge in myotonic muscle fibres. *J. Physiol. (London)* 240:505-13.
- 2.- Appel S.H., Roses A.D. 1976. Membrane biochemical studies in myotonic muscular dystrophy. En: membrane and disease. Ed. L. Bolis, J.F. Hoffman y A. Leaf Raven Press, N.Y. pp. 183-195.
- 3.- 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.
- 4.- Avoy D.R., Swyryd E.A., Gould R.G. 1965. Effects of α -p-chlorophenoxyisobutyryl ethyl ester (CPIB) with and without androsterone on cholesterol biosynthesis in rat liver. *J. Lipid. Res.* 6:369-376.
- 5.- Beeson P.B., McDermott W. 1971. Tratado de Medicina Interna. 14^a Edición. Ed. Interamericana pp.1666-1705.
- 6.- Brown G.L., Harvey A.M. 1939. Congenital myotonia in the goat. *Brian.* 62:341-363.
- 7.- Bryant S.H., Morales-Aguilera A. 1971. Chloride conductance in normal and myotonic muscles fibers and the action of monocarboxylic aromatic acid. *J. Physiol (London)*. 219: 363-383.
- 8.- Burns T.W., Dale H.E., Langley P.L. 1968. Normal and myotonic goats receiving diazacholesterol. *Am. Physiol* 209:1227-1232.

- 9.- Butterfield D.A., Chesnut D.B., Roses A.D., Appel S.H. 1976. Spin label study of erythrocyte membrane fluidity in myotonic and Duchenne muscular dystrophy and congenital myotonia. *Nature (London)* 263:159.
- 10.- Butterfield D.A., Watson W.E. 1977. Electron spin resonance studies of an animal model human congenital myotonia: increased membrane fluidity in rats with 20,25-diazacholesterol induced myotonia. *J. Membr. Biol.* 32:165-176
- 11.- Caughey J.E. 1968. Transitional forms between myotonia congenita dystrophia myotonic and paramyotonia congenita. *N.Z. med. J.* 67:347-350.
- 12.- Chalikian D.M., Barchi R.L. 1982 a. Sarcolemal desmosterol accumulation and membrane physical properties in 20,25-diazacholesterol myotonia. *Muscle & Nerve.* 5:118-124.
- 13.- Chalikian D.M., Barchi R.L. 1982 b. Membrane desmosterol and kinetics of the sarcolemmal (Na^+K^+) -ATPase in myotonia induced by 20,25-diazacholesterol. *Exp. Neurol.* 77:578-589.
- 14.- Chevais M. 1980. Bases pharmacologiques de l'utilisation des effets hipolipidemiants du clofibrate. *Therapie* 35:5-22.
- 15.- Davidsohn I, Henry J.B. 1974. Diagnostico Clínico para el Laboratorio. 5ª Edición. Editorial Salvat. pp.122-150, 477-570.
- 16.- Dromogoolle S.H., Champion D.S., Peter J.B. 1975 a. Myotonia induced by single doses of 20,25-diazacholesterol increased muscle and plasma desmosterol levels unaltered (Na^+,K^+) -ATPase activity of erythrocyte ghosts. *Biochem. Med.* 13:3074

- 17.- Dromogoole S.H., Campion D.S., Peter J.B. 1975 b. Myotonia induced by clofibrate and sodium chlorophenoxy-isobutirate. *Biochem. Med.* 14: 238.
- 18.- Dubowsky K.M. 1962. An o-toluidin method for body fluid glucose determination. *Clin. Chem.* 8:125.
- 19.- Eberstein A., Goodgold J. 1973. Myotonia induced with clofibrate. *Electromyogr. Clin Neurophysiol.* 13:141.
- 20.- Eyzaguirre C., Folk B.P., Zierler K.L., Linttentnal J.L. 1948. Experimental myotonia and repetitive phenomena the veratrinic effect of 2,4-dichlorophenoxy acetate (2,4-D) in the rat. *A.J. Physiol.* 155: 66-77.
- 21.- Fairhurst A.S., Lorenzen L., Reavie D. 1976. Altered trachea smooth muscle activities in an animal model of human myotonic dystrophyc. *Life.Sci.* 18:619.
- 22.- Fiehn W., Seiler D. 1975. Alteration of erythrocyte (Na⁺ + K⁺)-ATP ase by replacement of cholesterol by desmosterol. *Experientia.* 31:773.
- 23.- Furman R.E., Barchi R.L. 1981. 20,25-diazacholesterol myotonia an electrophysiological study. *Ann. Neurol.* 10:255-260.
- 24.- Geltener D., Chaco M., Shapiro M. 1975. Reversible myopathy induced by clofibrate. *Postgrad. Med.J.* 51:184.
- 25.- Goodman S.R., Shiffer K. 1983. The spectrin membrane skeleton of normal and abnormal human erythrocytes. *Am J. Physiol.* C121-C141. Vol. 244.

- 26.- Hainline A. 1958. Haemoglobin. En: Standar methods of clinical chemistry. Editado por Academic. Press. Inc. Vol. 2.
- 27.- Hobbs A.S., Bromback R.A., Festoff B.W. 1979. Monovalent cation transport in myotonic dystrophy Na^+ - K^+ pump ratio in erythrocytes. J. Neurol. Sci. 41: 299.
- 28.- Hofmann W.W., Rowe G., 1966. Electrophysiological study of myotonia. Nature 212:954.
- 29.- Hull K.L.Jr., Roses A.D. 1976. Stichiometry of sodium and potassium transport in erythrocyte from patients with myotonic muscle dystrophy. J. Physiol (London). 254:169.
- 30.- Knüfermann H., Bakidi S., Hoelzl Walach D.F. 1975. Rapid preparative isolation of major erythrocyte membrane proteins using poliacrilamida gel electrophoresis in sodium dodecylsulfate. Bioch. et. Bioph Acta. 389: 464- 476.
- 31.- Kuhn E., Draw W. Hahlke W., Pfisterer H. 1968. Myotonic nach 20,25-diazacholesterol ber der rate. Klin Wochenschr. 46: 1043.
- 32.- Kuhn E. 1973 Myotonia: The clinical evidence in new developments in electromyography and clinical neurophysiology. Vol. 1 Desmedt, L.E. Editado S. Karger Basel. pp. 413.
- 33.- Kwieciński H. 1978. Myotonia induced with clofibrate in rats. J. Neurol. 219: 107.
- 34.- Kwieciński H. 1980. Treatment of myotonic dystrophy with acetazolamide J. Neurol. 222:261.

- 35.- Kwieciński H. 1981. Myotonia induced by chemical agents C.R.T. Critical Reviews in Toxicology. 8: 279:310.
- 36.- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature. 227:680-685.
- 37.- Langer T., Levy R.J. 1968. Actue muscular syndro associated with administration of clofibrate. N. Engl. J. Med. 279: 256.
- 38.- 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.
- 39.- Lowry O. H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- 40.- Lynch M.J., Raphael S.S., Mellor L.D., Spare P.D., Inwood M.J.H. 1972. Metodos de laboratorio. 2ª edición. Editorial Interamericana. pp. 754-755.
- 41.- Manual de Instrumentation Laboratory. 1968. Manual para fotometría de flama. Instrumentation Laboratory.
- 42.- Mannistö P.T., Toumisto J., Jonuela A., Penttiliä O. 1975. Pharmacokinetics of clofibrate and chlorophenoxy isobutyric acid. I. Cross-over studies on human volunteers. Acta Pharmacol. Toxicol. 36:353-365.
- 43.- Martin D.W., Mayes Peter A., Rodwell Victor W. 1984 Bioquímica de Harper. Edición 9ª. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. 202-224.

- 53.- Peter J.B., Andiman R.M., Bowman R.L., Nagatomo T.. 1973. Myotonia induced by diazacholesterol: increased ($\text{Na}^+ \text{K}^+$)-ATPase activity of erythrocyte ghost and development of cataracts. *Exp. Neurol.* 41:738-744.
- 54.- Peter J.B. Fiehn W. 1973. Diazacholesterol myotonia accumulation of desmosterol and increased adenosine triphosphatase activity of sarcolemma. *Science.* 173:910.
- 55.- Peter J.B., Campion D.S., Dromgoole S.H., Nagatomo T., Andiman R.M. 1975. Similarities and differences between human myotonia and drug-induced myotonia in rats. En: *Recent advances in Myology*, Bradley, W.G. Garden Medwin D., Walton J.N. Ed. *Excerpta Medica, Amsterdam.* 434.
- 56.- Peter J.B., Campion D.S. 1978. Animal models of myotonia. En: *Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies.* Rowland, L.P. Ed. *Excerpta Medica, Amsterdam.* 439.
- 57.- Powanda Michael C., Henriksen Erick L. Ayala Eleanor, Canonico Peter G. 1976. Clofibrate induced alterations in serum protein patterns. *Biochemical Pharmacology.* 25:785-788.
- 58.- Putman F.W.J. 1960. *The plasma proteins* New York and London, Academic Press. Inc. 2:237-302.
- 59.- Ravin A. 1940. Studies in dystrophia myotonica. *Arch. Neurol. Psychiat.* 43:649-668.
- 60.- Reinhold J.G. 1953. Total protein, albumin and globulin. En: *standard methods of Clinical Chemistry.* Ed. Seligson D. Academic Press. 1:21-23.
- 61.- Robertis E.D.P. Robertis E.M.F. 1984. Ed. 142. *Editorial el Ateneo* pp. 129-168.

- 44.- Morales-Aguilera A. 1987. Modelos experimentales de miopatías. En: *Músculos esquelético y cardiaco (bases fisiológicas)* 12 Edición. Editado por Muñoz J., Pastelín G. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas y Alhambra Mexicana pp. 275-300.
- 45.- Nagatomo T., Petter J.B. 1975. (Na^+K^+) -ATPase activity in rats with 20,25-diazacholesterol-induced myotonia. *Exp. Neurol.* 47:97-104.
- 46.- Niebrój-Dobosz. I. Kwieciński H. 1983. Clofibrate induced myotonia in rats. *Acta. Neurol. Scand.* 67: 222-228.
- 47.- Niebrój-Dobosz I., Kwieciński H. Mrózek. 1976. Plasma membranes of muscle in experimental myotonia in rats. *J. Neurol.* 213:353-360.
- 48.- Ontell M., Paul H.S., Adibi S.A. Involvement of transverse tubules in induced myotonia. *Neuropathol. Exp. Neurol.* 38:596-605.
- 49.- Palade P.T., Barchi R.L. 1977. a. Characteristics of the chloride conductance in muscle fibers of the rats diaphragm. *J. Gen. Physiol.* 69:325-342.
- 50.- Palade P.T., Barchi R.L. 1977 b. On the inhibition of muscle membrane chloride conductance by aromatic carboxylic acid. *J. Gen. Physiol.* 69:879-896.
- 51.- Paul H.S., Adibi S.A. 1979. Paradoxical effects of clofibrate on liver and muscle metabolism in rats. *J. Clin. Invest.* 64: 405- 412.
- 52.- Paul H.S., Adibi S.A. 1980. Leucine oxidation and protein turnover in clofibrate induced protein degradation in rats. *J. Clin. Invest.* 65:1285-1293.

- 62.- Rothstein A.Z.I., Cabantchik P., Knauf. 1976.
Mechanism of anion transport in red blood cell:
role of membrane proteins. Federation Proc. 35:
3-10.
- 63.- Schröder J.M., Khun E. 1968. Zur Ultrastruktur
der muskelfaser bei der experimentellen "Myotonie"
mit 20,25-diazacholesterin. Virchows Arch. Pathol
Anat. Physiol. 334:181-195.
- 64.- Seiler D., Fiehn W., Kuhn E., 1975. Desmosterol ac-
cumulation in rats with experimental myotonia. Z.
Klin Chem. Klin. Biochem. 13:225.
- 65.- Senges J., Rüdell R. 1972. Experimental myotonia in
mammalian skeletal muscle: Changes in membrane pro-
perties. Pfluegers. Arch. 331:324-334.
- 66.- Somers J.E. Winer N., 1966. Reversible myopathy and
myotonia following administration of hypocholesterolemic agent. Neurology (Minneapolis). 16:761.
- 67.- Studier F.W. 1973. Analysis of bacteriophage T 7
early RNA's and proteins on slab gels. J.Mol. Biol.
79:237-248.
- 68.- Tanner M.J.A., Boxer D.H. 1972. Separation and some
properties of the major proteins of the human ery-
throcyte membrane. Biochem J. 129:333-347.
- 69.- Walker John M. 1984. Methods in Molecular Biology
Vol. 1. Proteins Humana. Press. Clifton, New Jer-
sey.
- 70.- Walton J.N. 1965. Disorders of voluntary muscle.
Landon: J. and A. Churchill Ltd. 2ª Edición. pp. 455
499.

- 71.- Weber K., Osborn M., 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. *J.Biol. Chem.* 244:4406-4412.
- 72.- Wilkening J., Wolpert F., Schwandt. 1978. Glycolytic metabolites and adenosine triphosphate in skeletal and cardiac muscle of rats after clofibrate feeding. *Biochem. Pharmacol.*(27):2:244-245.
- 73.- Winer N., Mart J.M., Somers J.E., Wolcottl Dale H.E., Burns T.W. 1965. Induced myotonia in man and goat. *J.Lab. Med.* 66:758-769.
- 74.- Winer N., Klackko D.M., Baer R.D., Langley P.L., Burns T.W. 1966. Myotonic response induced by inhibitors of cholesterol byosynthesis. *Science.* 153:312.
- 75.- Zar J.H. 1974. *Biostatistical Analysis*. Cap.12. Multiple Comparisions. Editorial Prentice-Hall Inc. Englewood Cliff, N.J. pp. 151-155.
- 76.- 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.

