

úlceras de Burulí, puesto que se tienen evidencias de que protegè contra estas enfermedades.

Más tarde (1996), se reporta la presencia de tres fracciones de glicopeptidolípidos apolares involucrados en la respuesta protectora, estudio que se realizó solamente con la cepa de referencia TMC 5135 de *M. habana*.

Por lo expuesto anteriormente, en este trabajo se realizó un estudio quimiotaconómico con las 33 cepas de *M. habana* y la cepa de referencia *M. habana* TMC 5135 (pertenecientes a la colección de laboratorio de los autores, única en el mundo) y dos serotipos de *M. simiae*, con el objetivo de conocer la composición de diferentes moléculas importantes en la caracterización de especies micobacterianas (especialmente las fracciones de glicopeptidolípido [GPL]) y comprobar si las 33 cepas de la colección mantenían el patrón reportado con anterioridad para tres glicopeptidolípidos apolares.

Materiales y Métodos

Se analizaron y compararon diferentes componentes lipídicos de 34 cepas de *M. habana* pertenecientes a la colección, con los de dos cepas de *M. simiae*

Para este estudio se utilizaron las siguientes técnicas: cromatografía en capa delgada unidimensional y bidimensional, cromatografía en capa delgada de alta resolución, cromatografía de gases, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, cromatografía de gases acoplada a masas con bombardeo electrónico y cromatografía líquida de alta resolución.

Los componentes estudiados fueron: ésteres metílicos de ácidos grasos, alcoholes, patrones de ácidos micólicos, glicolípidos y GPL presentes en dichas especies. Sobre la base de los resultados obtenidos, se estableció una comparación cualitativa en busca de posibles diferencias y semejanzas entre las especies estudiadas.

Resultados

Los patrones cromatográficos de ésteres metílicos de ácidos grasos, ácidos micólicos y glicolípidos en

Tabla. Modelos de glicopeptidolípidos diseñados para las cepas de *M. habana* y número de cepas agrupadas en cada uno de los modelos propuestos.

Glicopeptidolípidos	I	II'	III	IV	Número de cepas
Mh1	+	-	+	+	19
Mh2	+	+	+	+	3
Mh3	-	+	+	+	8
Mh4	-	-	-	-	3

Mh1: Modelo habana 1, Mh2: Modelo habana 2, Mh3: Modelo habana 3, Mh4: Modelo habana 4
II': nuevo glicopeptidolípido encontrado.

las dos especies fueron iguales. En estas cepas no se encontró la presencia de alcoholes y los productos de pirólisis fueron hasta el carbono C26. Sin embargo, en el estudio de GPL micobacterianos de las cepas de *M. habana* de la colección, se encontraron resultados no reportados previamente. Al analizar y comparar los patrones cromatográficos de las fracciones de GPL de las diferentes cepas de *M. habana* y *M. simiae*, se encontraron diferencias significativas, lo que permitió diseñar para *M. habana* cuatro modelos o patrones según la composición de GPL presentes no reportados hasta el momento. Además, se describió la presencia de un nuevo glicopeptidolípido. Esto constituye un hallazgo científico importante para esta especie micobacteriana cubana seleccionada como posible cepa vacunal y, a la vez, estos resultados podrán ser utilizados para elaborar nuevas estrategias para la selección de la cepa vacunal. Los GPL micobacterianos pueden ser utilizadas como control en la elaboración del futuro inmunógeno.

Bibliografía

Mederos LM, *et al.* A chemotaxonomic study of 32 strains of *Mycobacterium habana*. Revista Española de Quimioterapia 1997;10 (Sup 2).

Mederos LM, *et al.* Analysis of lipids reveals differences between *Mycobacterium habana* and *Mycobacterium simiae*. Microbiology 1998;144: 1181-8.

Factores tóxico-nutricionales y neuropatía epidémica. Programa de investigaciones "SECUBA"

✉ Rafael Pérez Cristiá,¹ Pedro Fleites Mestre,¹ Tomás Verdura Barrios,² Jacques Barnouin,³ Michelle Chassagne,³ Josiane Arnaud⁴

¹Centro Nacional de Toxicología. ²Instituto Finlay, Ciudad de La Habana, Cuba.

³Unidad de Ecopatología, INRA de Theix, Francia. ⁴Laboratorio de Biología del Estrés Oxidativo, Universidad "J. Fourier", Grenoble, Francia.

Introducción

Durante el período 1994-1997 se desarrolló el programa de investigaciones "SECUBA", con la colaboración de equipos de investigadores cubanos y franceses. Este programa fue propuesto en el Taller Internacional sobre Neuropatía Epidémica (NE), celebrado en julio de 1994, para dar continuidad a las investigaciones sobre la hipótesis tóxico-nutricional como causa de esta enfermedad.

El objetivo de este programa fue estudiar los diferentes factores de riesgo tóxico-nutricionales asociados con la NE y su posibles variaciones estacionales en el transcurso de un año.

✉ Autor de correspondencia

Materiales y Métodos

La población estudiada incluyó voluntarios masculinos sanos con edades entre 30 y 50 años: 100 fumadores y 100 no fumadores del municipio La Lisa, Ciudad de La Habana; 68 fumadores residentes en el municipio Caimanera, Guantánamo (municipio no afectado por la epidemia); y 51 enfermos de NE de la provincia Pinar del Río. Todos fueron sometidos previamente a examen clínico para descartar la presencia clínica o subclínica de NE en los sanos y para confirmar el diagnóstico de NE en los enfermos.

Se realizaron encuestas de salud, hábitos de vida (hábitos tóxicos como el tabaquismo o exposición a

tóxicos ambientales, entre otros) y hábitos nutricionales (durante una semana). De igual forma, se tomaron muestras de sangre y orina para el análisis de 50 marcadores biológicos (de estrés oxidativo, metabolismo proteico y energético, minerales y oligoelementos, vitaminas y otros parámetros). Los aportes de los alimentos y la cobertura de necesidades nutricionales fueron analizados mediante la base de datos NUTRISIS según los requerimientos de la población cubana.

Con la información obtenida se confeccionó una base de datos y un programa en Access (versión 2.0) denominado EPIBASE. Los análisis estadísticos se efectuaron paralelamente por los grupos de trabajo cubano y francés según la estrategia establecida, con la ayuda de los programas estadísticos SAS (versión 6.11) en Unix y NCSS (versión 6.0). Se realizaron análisis univariados y multivariados (regresión logística) para todas las variables y grupos de estudios.

Resultados y Discusión

Los resultados principales de las investigaciones del Programa SECUBA señalan un incremento del estrés oxidativo en la población estudiada, expresado por valores elevados en los índices de peroxidación lipídica (TBARS), un estado deficitario de vitamina B₂ y baja disponibilidad de carotenos, fundamentalmente de α y β -caroteno. Estos indicadores variaron en los cuatro períodos del estudio, de los cuales el segundo resultó el menos desfavorable (julio/95), con valores más bajos de TBARS, mayor ingestión de carotenos y valores séricos más altos de β -caroteno. Por el contrario, los niveles más críticos fueron encontrados en el tercero (octubre/95), con valores significativamente más altos de TBARS, bajos en la ingestión de carotenos y bajos de β -caroteno sérico, en comparación con el segundo. Otros factores presentes son el déficit de energía (por aporte insuficiente de grasas) y un fondo de carencia y subcarencia de vitaminas E, B₁, B₁₂, y ácidos grasos y calcio.

Se comprobó que el hábito de fumar agudiza el déficit de carotenos y vitamina B₂, sin diferencias significativas en estos aportes por la alimentación entre fumadores y no fumadores.

Los enfermos de NE, en relación con los voluntarios de La Lisa, se caracterizaron por una menor defensa antioxidante asociada a niveles más bajos de α -caroteno, glutatión-peroxidasa y albúmina, y una mayor disfunción del metabolismo energético, con niveles más elevados de 3-hidroxiacetil-CoA. Esta condición fue desarrollada por un mayor desequilibrio nutricional correspondiente a un menor aporte dietético.

Los factores de protección contra NE, al comparar los voluntarios de Caimanera con los de la Lisa, se relacionan con una mejor defensa antioxidante dada por mayores niveles séricos de β -caroteno y selenio, mejor estatus de vitamina B₂ y mejor funcionamiento del metabolismo energético, expresado por niveles significativamente más bajos de 3-hidroxiacetil-CoA, y desde el punto de vista nutricional por un mayor aporte de grasas, proteínas, calcio y vitamina B₂.

En resumen, en este estudio se pudo comprobar un desbalance entre los factores antioxidantes y prooxidantes en detrimento de los primeros, como

consecuencia de un desequilibrio nutricional que se agudiza en el caso de los enfermos de NE. Esto dio lugar a un incremento del estrés oxidativo por una deficiente defensa antioxidante. El consumo inadecuado de nutrientes antioxidantes por los malos hábitos dietéticos, asociado a desequilibrios en el aporte de otros, tiene el mayor peso en este desbalance y se caracteriza por una variación estacional.

El programa SECUBA permitió poner en evidencia la presencia de un riesgo general por incremento del estrés oxidativo en las poblaciones estudiadas tanto sanas como afectadas por NE, y la importancia de adecuados aportes y niveles biológicos, entre otros, de nutrientes antioxidantes como protectores contra la NE de los efectos del estrés oxidativo.

Los resultados del programa SECUBA demuestran la participación del estrés oxidativo y del déficit de antioxidantes en la patogenia de la NE, lo que se corresponde con los mecanismos fisiopatológicos y los cambios morfológicos característicos de las neuropatías tóxico-metabólicas o por déficit nutricional. Todo lo anterior permite considerar a la neuropatía epidémica como una enfermedad multifactorial desencadenada por factores tóxico-nutricionales y vinculada al estrés oxidativo.

El programa SECUBA aporta un sistema validado para la vigilancia y control del balance antioxidantes-prooxidantes (estrés oxidativo) sobre poblaciones. Para esto dispone de un conjunto de marcadores biológicos integrados a un protocolo de información sobre salud, hábitos de vida y alimentación. Se desarrolló un programa automatizado (EPIBASE) que permite la estandarización de los diferentes estudios que se efectúan en este sentido, lo que constituye una herramienta de valor para abordar esta temática.

Por otra parte, estos resultados permiten alertar sobre el posible incremento de enfermedades crónicas vinculadas al estrés oxidativo y al déficit de antioxidantes, y permiten desarrollar medidas de prevención vinculadas a un mayor consumo de alimentos ricos en nutrientes antioxidantes, lo que incidiría en la mejoría del cuadro de salud y en la calidad de vida de nuestra población.

Se reconoce la colaboración de C Campa, G Sierra, N González, A Maciques, Instituto "Finlay"; T Hernández, T Conill, S Suárez, E Rodríguez, CENATOX; I García, L Ledesma, A Galán, IFAL; M Santín, C Serrano, Dirección Nacional de Epidemiología, MINSAP; C Santos, N Pérez, CIMEQ; L Regal, I Mesa, Sectorial de Salud La Lisa; H Gautier, Instituto de Hematología e Inmunología; M Morales, A Sotolongo, Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Pinar del Río; BE Eliot, M Sánchez, Hospital "Abel Santamaría", Pinar del Río; ME Montoya, Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Guantánamo. Se agradece, además, la colaboración de los técnicos O Toste, A Velázquez, J Delgado, A Mesa, CENATOX. También se reconoce la labor de los especialistas franceses que trabajaron en esta investigación: V Azais-Braesco, D Bauchart, JP Charconac, E Combe, Drr N, P Grolier, P Pichenot, F Rocca F, JC Tressol, del INRA, Theix; JF Dartigues, INSERM U330; A Favier, Facultad de Farmacia, Grenoble; y JC Renversez y MJ Richard, de Bioquímica A CHU, Grenoble.

Bibliografía

Verdura T, Arnaud J, Pérez Crisité R, Tressol JC, Fleites P, Chassagne M, *et al.* Trace element status in Cuba. Relationships with Epidemic Neuropathy through SECUBA Protocol. En: Neve, *et al.*, editors. Therapeutic Uses of Trace Elements. New York: Plenum Press; 1996. p.391-4.

Fleites P, Verdura T, Pérez Crisité R, Arnaud J, Barnouin J, Chassagne M, *et al.* "SECUBA" Program. Toxic-nutritio risk and epidemic neuropathy in Cuba 1. Biological markers, antioxidant defence, disease

risk and protection factors. J Trace Elem Exp Med 1998;11:498-9.

Borrajero I, Pérez JL, Domínguez C, Chong A, Coro RM, Rodríguez H, *et al.* Epidemic neuropathy in Cuba: Morphological characterization of peripheral nerve lesion in sural nerve biopsies. J Neurol Sci 1994;127 (en prensa).

The Cuban Neuropathy Field Investigation Team. Epidemic optic neuropathy in Cuba-Clinical characterization and risk factors. N Engl J Med 1995;333: 1176-82.

Obtención de plantas transgénicas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*: una nueva metodología para la transformación genética de esta gramínea

✉ Gil A Enríquez-Obregón,¹ Roberto I Vázquez-Padrón,¹ Ariel D Arencibia,¹ Dmitri Prieto-Sansonov,¹ Elva R Carmona,¹ Pilar Tellez-Rodríguez,¹ Gustavo A de la Riva,¹ Luis E Trujillo,¹ Guillermo Selman-Houssein,¹ Pedro Oramas,¹ Fidel Hernández,² Domingo Blanco,² Marlén Pérez,¹ Ariel Cruz¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. AP 6162, La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 21 4764; E-mail: gustavo.riva@cigb.edu.cu. ²EPICA de Jovellanos, Matanzas, Cuba.

Introducción

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es uno de los cultivos más extendidos en las regiones tropicales y subtropicales. La industria azucarera y la obtención de productos químicos como el furfural, dextranas y alcohol, dependen de las zafras. Además, los subproductos del proceso de producción de azúcar representan una valiosa fuente para la alimentación animal. La ingeniería genética ha permitido obtener variedades de este cultivar con características no presentes en su fondo genético. Mediante electroporación de células intactas y biolística, se han obtenido plantas transgénicas de caña de azúcar resistentes al ataque del bórer (*Diatraea saccharalis*) [1] y al herbicida BASTA® [2], respectivamente.

Las metodologías de transformación que utilizan *Agrobacterium tumefaciens* para transferir ADN a las células vegetales, ofrecen la ventaja de transferir genes al genoma vegetal en forma limitada, con reproducibilidad y sin necesidad de utilizar equipos costosos. En este trabajo se desarrolló una metodología para introducir, de manera estable, genes foráneos en células de caña de azúcar mediante la utilización de *A. tumefaciens*. Como explantes se utilizaron meristemos y callos de la variedad comercial Ja60-5, tratados previamente con una mezcla de compuestos antioxidantes. Este tratamiento disminuyó la muerte celular, lo que mejoró la competencia del tejido vegetal y, de este modo, la frecuencia de transformación genética.

Procedimientos y Resultados

Construcción del vector binario pGT GUSBAR

Para el establecimiento de las condiciones de transformación se utilizó la cepa At 2260 transformada con el plásmido pGT GUSBAR, que porta los genes repor-

teros *uidA* (codifica la β -glucuronidasa [GUS] de *E. coli*) y *bar* (que codifica la fosfotricina-acetiltransferasa), bajo señales apropiadas para la regulación de la transcripción en plantas monocotiledóneas [3].

Evaluación del efecto de los compuestos antioxidantes sobre la necrogénesis de los explantes y callos de caña de azúcar

Para obtener explantes de caña de azúcar con índices de necrogénesis bajos en la superficie de las zonas de corte, y con una elevada competencia para ser transformados por *At*, se evaluaron tres compuestos antioxidantes: el ácido ascórbico, la cisteína y el nitrato de plata, durante el estadio de precultivación (Tabla 1). Se tomó como criterio de viabilidad celular la fracción meristemática que permaneció sin teñir frente al reactivo Evans Blue. Cada compuesto se probó en dos concentraciones diferentes de manera individual en medio líquido P+5 [4]. En todos los casos se observó una disminución en la necrogénesis del explante después de 60 h de incubación (Tabla 1).

A pesar de que la hipersensibilidad del explante disminuyó en cada tratamiento, los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó la mezcla de estos compuestos. En este caso, la necrosis en el meristemo fue inhibida hasta en 90%. Este resultado evidencia la posibilidad de sinergismo entre los antioxidantes para disminuir la respuesta de hipersensibilidad en la célula vegetal.

El efecto de los antioxidantes sobre la formación de los callos fue estudiada utilizando explantes meristemáticos. Los tratamientos AAS1, CIS1, Ag1 y AO permitieron la formación de callos amarillentos y friables con alta capacidad de regeneración, similares a los obtenidos con los explantes sin tratar (Tabla 1). Cuando se utilizaron altas concentraciones de los compuestos antioxidantes, los callos generados resultaron opacos y blandos (tipo III) con una baja capacidad de regeneración.

1. Arencibia A, Vázquez R, Prieto D, Tellez P, Carmona E, Coego A, *et al.* Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. Mol Breeding 1997;3:247-55.

2. Gallo-Meagher M, Irvine JM. Herbicide-resistant transgenic sugarcane plants containing the bar gene. Crop Sci 1996; 36:1367-74.

3. Enríquez-Obregón GA, Vázquez Padrón RI, Prieto-Sansonov DL, Pérez M, Selman-Houssein G. Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidant compounds. Biotecnología Aplicada 1997; 14:169-174.

4. Enríquez-Obregón GA, Vázquez Padrón RI, Prieto-Sansonov DL, de la Riva GA, Selman-Houssein G. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. Planta 1998;206:20-7.