

MISCELÁNEAS

REFLEXIONES SOBRE LA MEMORIA DEL AGUA Y LOS ESPECTROS INFRARROJOS EN EL AREA DE SALUD: A PROPÓSITO DE DETERMINAR LA COMPOSICIÓN CORPORAL CON ISÓTOPOS ESTABLES.

REFLECTIONS ON WATER MEMORY AND INFRARED SPECTRA IN THE HEALTH AREA: A PURPOSE OF DETERMINING BODY COMPOSITION WITH STABLE ISOTOPES.

Dr. José Luis San Miguel Simbrón ¹

¹ Unidad de Crecimiento y Desarrollo Infante-Juvenil, Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo (IINSAD). Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.

Docente Investigador Titular Emérito; Médico Pediatra Inmunólogo; Docente de Fisiología Humana, Cátedra de Fisiología. Dirección de contacto con el autor (Corresponding autor): Dr. José Luis San Miguel S., Unidad de Crecimiento y Desarrollo Infante-Juvenil, Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo (IINSAD). Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. Calle Claudio Sanjinez S/N, frente al Instituto del Tórax, Miraflores. E-mail: josanto10@yahoo.es

RESUMEN

Se presenta conceptos sobre la determinación de la composición corporal a través del uso de la técnica de isótopos estables, como el deuterio, mediante el uso de muestras de saliva en escolares de gran altitud. Dichas muestras se encuentran enriquecidas por el óxido de deuterio en todo el cuerpo del escolar y son analizadas con la espectrometría infrarroja con transformada de Fourier. En la actualidad, en el campo de la electromagnética, se hace hincapié sobre una nueva propiedad de las secuencias de ADN bacteriano que inducen a la producción de ondas electromagnéticas, resaltando la “memoria que tiene el agua” al poder mantener los fragmentos de ADN por largo tiempo, que son generadores de señales, definidos como “Biomarcadores”, que permitirían la detección de infecciones bacterianas crónicas en el organismo humano a través del uso de la electromagnética. La reflexión a la que se llega, es que muestras de saliva contaminadas con microorganismos, como las bacterias, interfieren con la medición del enriquecimiento de deuterio identificada por el equipo FTIR. Se deja como lección aprendida, el insistir sobre la higiene oral previa a la hora de tomar muestras de saliva, que minimice la contaminación con microorganismos, para lograr determinar el enriquecimiento alcanzado con el deuterio, y así no incurrir en el error de medición que daría resultados no reales del agua corporal total de los sujetos estudiados.

Palabras clave: Isótopos estables, deuterio, espectroscopia infrarroja, ADN bacteriano, memoria del agua, infección bacteriana crónica.

ABSTRACT

This work presents concepts about determining body composition by using the stable isotope technique, as deuterium, using saliva samples in school children at high altitude. These samples are achieved by the enrichment of deuterium oxide in the whole body of the school children and then are analyzed with Fourier transform infrared spectrometer. Currently there is an emphasis on a new property of the bacterial DNA sequences that induce the production of electromagnetic waves, that highlights the “water memory” to be able to maintain the DNA fragments, signal generators that are defined as

“Biomarkers”, which allow the detection of chronic bacterial infections in the body. A reflection is that saliva samples contaminated with microorganisms such as bacteria interfere with the measurement of the deuterium enrichment identified by FTIR equipment. The learnt lesson is about oral hygiene, which minimizes contamination with microorganisms from the saliva samples to determine the enrichment achieved with deuterium, and not to make the mistake of measuring actual results would total body water of the subjects studied.

Key words: Stable isotopes, deuterium, infrared spectroscopy, bacterial DNA, water memory, chronic bacterial infection

PODER DE RESOLUCIÓN DE INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN EN BIOLOGIA CELULAR

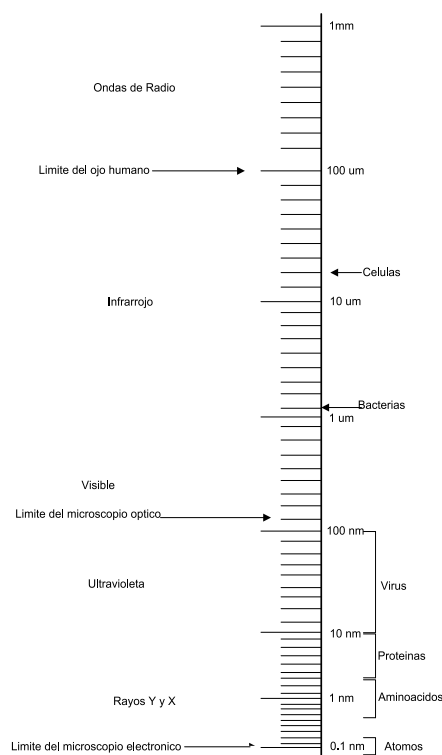
Desde tiempos antiguos el ser humano ha tenido curiosidad por todo lo que lo rodea y por sí mismo. En la búsqueda de mayor información y conocimiento, el sentido de la visión ha sido su mejor aliado. El poder de discriminación del ojo humano, se verifica al resolver dos puntos como separados por más de 0.1 mm (100 μm). En ese sentido el uso del microscopio óptico ha permitido un aumento de 500 veces más que la resolución del ojo, y el microscopio electrónico logra un incremento de 500 veces más que el microscopio óptico.

En los sistemas biológicos, las dimensiones están determinadas por los límites impuestos artificialmente por el poder de discriminación de los instrumentos utilizados. La microscopía óptica logra niveles de resolución de 0.2 μm . Las células y principalmente su contenido son mucho más pequeños y necesitan de un poder de discriminación mucho mayor, el microscopio electrónico es útil a estos niveles, de 0.1 nm. Llegando de esta manera a realizar mediciones directas de estructuras que se hallan entre los 0.4 a 200 nm. Estos niveles macromoleculares, pueden ser mejorados al estudiar las moléculas de proteínas, de ácidos nucleicos, y virus a través de la difracción de rayos X. A nivel atómico, el uso de la fluorescencia de rayos-X por reflexión total, permite excitar a átomos individualmente por la radiación de fluorescencia, emitiendo rayos-X secundarios propios de cada elemento, a los que se cualifica y cuantifica en un espectro, este método es sensible para detectar magnitudes del orden de $\mu\text{g-l}^{-1}$ (100 μm), en el análisis espectrométrico.

La figura 1, muestra en escala logarítmica las dimensiones microscópicas según De Bessis,

los tamaños de las células, bacterias, virus y moléculas, comparándolas con **longitudes de onda** del espectro electromagnético de distintas radiaciones, con los límites de resolución del ojo, el microscopio óptico y el electrónico.

Figura N° 1. Escala logarítmica de dimensiones microscópicas. Cada división principal representa un tamaño 10 veces menor que la precedente. A la izquierda se indica la posición de las diferentes longitudes de onda del espectro electromagnético y los límites de resolución del ojo humano, del microscopio óptico y del microscopio electrónico. A la derecha se indica los tamaños de las células, las bacterias, los virus, las moléculas y los átomos. (De Bessis, modificado).



Fuente: De Robertis E.D.P. Biología celular y molecular. 12va. ed. Buenos Aires: El Ateneo; 1998.

DIMENSIONES BIOLÓGICAS

Lo interesante, en este análisis, es distinguir que la medición directa de estructuras macro y micro moleculares es posible con instrumentos de altísimo nivel de precisión y también de altísimo costo. Sin embargo, desde varias décadas atrás, se ha podido comparar, asociar, relacionar, la posición de los diferentes niveles de **longitud de onda** del espectro electromagnético, el ojo humano, el microscopio óptico y el electrónico, versus el tamaño de las diferentes células, bacterias, virus, moléculas y átomos. Si deseamos medir aminoácidos, tendremos que buscar y disponer de equipos de rayos-X como el indicado más arriba.

El espectro infrarrojo, daría la oportunidad de obtener niveles de detección para células, bacterias (10 a 0.2 μm). Sin embargo, si bien las podría detectar, no tiene la ventaja de poder verlas como tales, y sí lo haría el microscopio óptico, y desde ya con un personal adiestrado para esta identificación.

En el cuadro 1, se presentan las asociaciones entre la dimensión lineal y los pesos utilizados en el campo del análisis químico en la biología celular y molecular.

Los componentes importantes de la célula pueden ser expresados en picogramos, que es 1 pg = 1 μg = 10^{-12} g.

Las moléculas se expresan en dalton (Da), siendo equivalente un dalton al peso de un átomo de hidrógeno. La expresión frecuente es 1 kDa = 1000 Da.

Una molécula de agua pesa 18 Da, y una molécula de hemoglobina pesa 64.5 kDa.

Cuadro N° 1

Dimensión lineal y los pesos usados en el campo de análisis químico.

Dimensión lineal	Peso	Terminología
1 cm	1 g	Bioquímica convencional
1mm	1 mg, 10^{-1} g	Microquímica
100 μm	1 ug, 10^{-6} g	Histoquímica-- Ultramicroquímica
1 μm	1 pg, 10^{-12} g	Citoquímica— Ultramicroquímica

Fuente: De Robertis E.D.P. Biología celular y molecular. 12va. ed. Buenos Aires: El Ateneo; 1998.

El cuadro 2, muestra distintos niveles de dimensión, en los que se identifica a valores que distinguen la evaluación de sistemas biológicos.

Cuadro N° 2. Dimensiones de los sistemas biológicos

Dimensión	Rama	Estructura	Método
0.1 mm (100 μm) y más	Anatomía	Órganos	Ojo y lente simple
100 – 10 μm	Histología	Tejidos	Varios tipos de microscopios ópticos
10 – 0.2 μm (200 nm)	Citología	Células. Bacterias	Varios tipos de microscopios ópticos Microscopía de rayos X
200 – 1nm	Morfología submicroscópica. Ultraestructura	Componentes celulares. Virus	Microscopiapolarización, Microscopía electrónica
Menos de 1 nm	Biología molecular. Estructura molecular, atómica	Disposición de átomos	Difracción de rayos X

Fuente: De Robertis E.D.P. Biología celular y molecular. 12va. ed. Buenos Aires: El Ateneo; 1998.

ESPECTROMETÍA INFRARROJA.

La Espectroscopia infrarroja tiene más de 127 años de existencia, la misma se fundamenta en los movimientos vibracionales intramoleculares. Las primeras vibraciones moleculares fueron identificadas por primera vez en un espectro en el año 1881 por Abney y Festing, en infrarrojo cercano lograron fotografiar el espectro de absorción de 48 líquidos orgánicos. Ellos

encontraron bandas características en estos espectros que las asociaron con la presencia de hidrógeno en las moléculas estudiadas. Así, Julio en 1892, logró obtener el espectro infrarrojo de 20 compuestos orgánicos, identificando que todos los compuestos que tenían metilo (CH_3), tienen una banda de absorción de **longitud de onda** de 3.45 μm . El llegó a la conclusión que la absorción de “ondas caloríficas” es causada por

los movimientos intramoleculares, la estructura interna de la molécula determina el tipo de absorción. Así mismo, estableció que no se puede predecir el espectro de absorción de un compuesto a partir de conocer los espectros de los átomos que lo constituyen, por lo tanto no tienen un efecto aditivo el conocimiento previo de estos espectros.

Los espectrómetros infrarrojos son herramientas de las más importantes para observar espectros vibracionales. Las características más relevantes de esta espectroscopia son:

1. Los espectros infrarrojos serán distintos, si dos moléculas están formadas por átomos distintos, o por tener distinta distribución isotópica, o por distinta configuración, o por encontrarse en ambientes distintos.
2. Una sustancia posee "huellas digitales" y las mismas pueden identificarse por su espectro infrarrojo, por lo tanto sus espectros son sus huellas.
3. Los espectros demuestran bandas que son típicas de grupos funcionales particulares, y tienen localizaciones e intensidades específicas dentro de los espectros infrarrojos.
4. A partir de los espectros se pueden **inferir** las estructuras moleculares. Se requiere para ello un modelo en el cual se basarán los cálculos.
5. El tiempo necesario para obtener y almacenar un espectro infrarrojo es del orden de minutos.

Toda sustancia está constituida por átomos, estos están unidos para constituir una molécula, y estas uniones se basan en las fuerzas electrostáticas, parecerían uniones elásticas, y por lo tanto sus movimientos son periódicos o cuasi-periódicos. Todos los movimientos de los átomos son en realidad la superposición de los "modos normales de las vibraciones", este define el espectro vibracional de cada molécula. Estos movimientos pueden ser de tipo: traslación, rotación y vibración.

El espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier.

Se clasifican a los espectrómetros como los dispersivos y los de transformada de Fourier. Este último consta de tres elementos básicos: una fuente luminosa, un interferómetro de Michelson

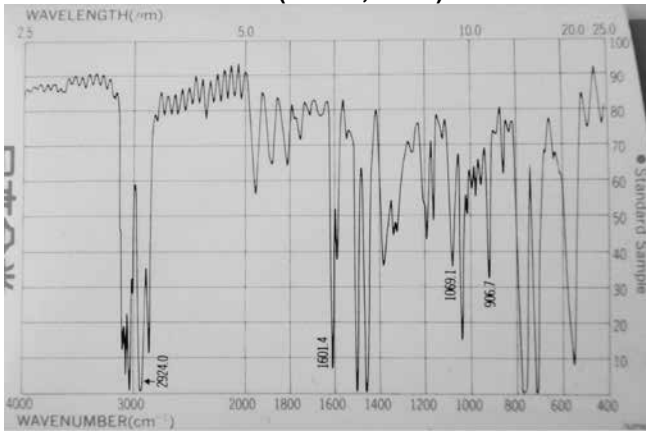
y un detector. Funciona de la siguiente manera: desde una fuente de luz infrarroja, se produce un haz colimado, la misma que incide sobre un divisor de haz, para el caso es un divisor de infrarrojo medio. Este haz incidente se divide en dos haces perpendiculares de igual energía, uno de ellos incide sobre el espejo móvil y el otro sobre el espejo fijo. Los haces son reflejados por ambos espejos y se recombinan al llegar al divisor de haz. Esto genera una interferencia, que puede ser constructiva o destructiva, dependiendo de la posición relativa del espejo móvil con respecto del espejo fijo, el haz resultante pasa a través de la muestra, donde sucede una absorción selectiva de **longitudes de onda** y, finalmente llega al detector. Aquí interviene la transformada coseno de Fourier.

La información recabada por el detector es usada para obtener el Interferograma, el cual es digitalizado. Una computadora desarrolla el cálculo aproximado de la transformada de Fourier del interferograma, debido a que después de digitalizar la información, ya no se puede trabajar con variables continuas, es decir que la distancia x y la frecuencia y , pasan a ser variables discretas, como tales corresponden al espectrograma digitalizado y es desplegada en la pantalla de la computadora.

Instrumentos con técnica de espectrometría infrarroja, para la determinación del Deuterio.

El espectro infrarrojo está dividido en varias partes correspondientes a la fase infrarroja de la luz, que no son vistas o detectadas por el ojo humano. En la actualidad, existen equipos con técnica fundamentada en la luz infrarroja que permiten detectar diferentes componentes acorde al número de onda en los que fueron identificados. Es así, que a un número de onda de 2504 cm^{-1} , que es una onda propia del **deuterio**, y representa a la absorbancia (que puede expresarse como longitud de onda $3.994 \mu\text{m}$, y como frecuencia 75.07 Thz), el mismo puede ser identificado en su abundancia o enriquecimiento en un determinado reservorio biológico, por ejemplo en la saliva. Para este propósito ha sido validada la técnica de la espectrometría infrarroja con transformada de Fourier, que nos da esta información (Cuadro 3, Figura 2).

Figura N° 2. Número de ondas identificadas por el FTIR (Jasco, 4100)



Cuadro N° 3. Comparación entre diferentes escalas de medición del deuterio.

Número de onda	Longitud de onda	Frecuencia
2504 cm ⁻¹	3.994 µm	75.07 THz

DETERMINACION DE DEUTERIO EN NUESTRO MEDIO DE ALTITUD.

Ahora bien, luego de haber descrito diferentes componentes del conocimiento sobre la espectroscopia infrarroja, toca informar sobre el trabajo que estamos realizando hace varios años, con sujetos de estudio que son niños y mujeres de nuestro contexto de gran altitud.

Uso de isótopos estables.

El objetivo fue determinar la composición corporal de los sujetos de estudio, para mejorar el conocimiento obtenido a través de mediciones antropométricas que venimos ejecutando desde hace varios años atrás, con estas no se puede determinar la composición corporal con niveles adecuados de precisión, como lo hacen en poblaciones del nivel del mar. A través de la **Fisiología de Altura**, se puede comprender como se organiza y se inicia el funcionamiento de miles de seres humanos de nuestro medio de altitud, por medio de varias vías metabólicas que funcionan en forma diferente a como funcionan a nivel del mar.

En ese sentido, como antecedente esta el estudio de la **síntesis de proteínas**, que nuestro equipo de investigación ha trabajado desde los años 90, tiempo en el que se incorporó el uso de las técnicas nucleares con isótopos estables, como el carbono 13 (¹³C), la misma nos ha permitido estudiar la

síntesis de proteínas en escolares de gran altitud versus escolares de baja altitud, en los primeros se muestra inicialmente que la síntesis de proteína es mayor a gran altitud. En un segundo estudio se ha evaluado la síntesis proteica en escolares con y sin parasitosis intestinales, se demostró que la síntesis de proteína es mayor en presencia de parasitosis intestinal, específicamente de la *Giardia lamblia*.

Otra técnica isotópica estable utilizada, fue la del Deuterio (²H), que ha permitido determinar la composición corporal de niños y niñas de gran altitud, desde la etapa de lactantes hasta la de escolares. A través del método fisiológico de la **dilución isotópica**, fundamentada en el principio del “**equilibrio de masas**”, se puede establecer que:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Donde C₁ es la concentración inicial, en este caso del Deuterio; V₁ es el volumen inicial, líquido en el que esta contenido el Deuterio; C₂ es la concentración final del Deuterio y V₂ es el volumen final, a nivel corporal.

Si se despeja esta ecuación, se puede establecer que:

$$V_2 = C_1 \times V_1 / C_2$$

En este caso, V₂ es el volumen de líquido corporal desconocido, que representaría el **Agua Corporal Total** (ACT) del sujeto de estudio.

C₁ y V₁, son la concentración de deuterio y el volumen de líquido en el cual esta diluido el deuterio, ambos son conocidos.

C₂, es la concentración de deuterio que existiría en el cuerpo del sujeto de estudio, posterior al consumo de la dosis de deuterio que se le administro por kg/peso corporal.

En el método utilizado para evaluar el agua corporal total es: A la cantidad basal de deuterio que tiene el sujeto de estudio, se le incorpora una cantidad enriquecida de una dosis de deuterio internacionalmente usada, y tras unas horas post dosis de consumo del deuterio, se producirá un “**estado de equilibrio**” fisiológico del deuterio en el organismo, al distribirse el deuterio en el espacio extracelular y en el intracelular del sujeto

de estudio. Pasadas las 3 horas, de consumo del deuterio, se obtienen muestras de saliva del sujeto de estudio, para el análisis y medición de las mismas en el FTIR.

ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE DEUTERIO EN EL CUERPO.

La información aportada en el subtítulo de **Dimensiones Biológicas** (Cuadro N° 2), nos permite asociar que a **longitudes de onda** entre los 10.0 a 0.2 μm , sería posible detectar células y bacterias. Por lo tanto, al utilizar el equipo de FTIR, se puede obtener el **número de onda** en un rango de 2300 a 2900 cm^{-1} de detección. En consecuencia, tomando en cuenta el Cuadro N° 3, la **longitud de onda** que puede detectar nuestro FTIR es de 3.66 μm a 4.62 μm , y por lo tanto sería posible detectar “**señales**” de bacterias o sus componentes en las muestras de saliva, además del deuterio.

Ahora bien, si consideramos a los **errores de medición**, estos tienen mucho que ver con la precisión y la confiabilidad de la medición. Cuando un factor se interpone o interfiere en una medición, pudiendo ser desconocido, lo denominamos factor confundente. Para evitar factores confundentes en el uso de técnicas isotópicas estables, la refrigeración y congelación, son recomendadas para minimizar el crecimiento de bacterias y moho, los cuales pueden producir agua metabólica y podrían diluir la muestra que contiene el isótopo y en consecuencia pasa a ser un factor confundente.

En ese sentido, se establece que durante el manejo manual de las muestras biológicas, lo más importante es minimizar la evaporación y la contaminación. Si nos enfocamos en la contaminación, la misma puede ser concebida primero como **contaminación cruzada**, que puede haber entre los recipientes que contienen deuterio, ya que mínimas cantidades del orden de pocos μl del mismo estarían interfiriendo con el análisis de la muestra de saliva enriquecida, en este caso, la contaminación con deuterio extra, generaría una medición incrementada de la concentración de Deuterio en la muestra de saliva, y como consecuencia habría un valor de ACT disminuido, que nos llevaría indirectamente a declarar masa grasa **incrementada** en el sujeto de estudio. En

segundo lugar, tenemos a la **contaminación bacteriana o por moho**, esta contaminación llevaría a la producción de agua metabólica, misma que diluiría la muestra enriquecida con deuterio, generando una medición disminuida de la concentración de deuterio en la muestra de saliva y como consecuencia habría un valor de ACT aumentado, que nos llevaría indirectamente a declarar masa grasa **disminuida**, situación inversa a la del primer caso.

RESULTADOS DE ENRIQUECIMIENTO CON DEUTERIO EN EL LABORATORIO, DE LA UNIDAD DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO INFANTO-JUVENIL A GRAN ALTITUD.

Es fundamental indicar que se presentan estos resultados, sin el propósito de realizar un análisis por el método estadístico de los mismos, ni de alcanzar conclusiones definitivas, sino para presentar una descripción de algunos resultados correspondientes a la medición de algunas muestras de saliva de nuestros escolares, estimándose que puedan dejar lecciones relevantes y por sobre todo reflexiones científicas sobre nuestro actual y futuro trabajo en el campo del uso de técnicas isotópicas estables. Se presentan resultados de una primera medición de muestras de saliva marcadas con deuterio realizada en La Paz, Bolivia (3600 m.s.n.m.), y una segunda medición de las mismas realizada en otro laboratorio a nivel del mar.

Cuadro 4. Valores de enriquecimiento con óxido de deuterio de las muestras de saliva analizadas en diferentes laboratorios.

	Enriquecimiento Isotope-Jasco, La Paz (ppm) ¹	Enriquecimiento Isotope-Affinity, a nivel del mar (ppm) ²
	n=84	n=65
Media	814.5	1584.2
Mediana	806.1	884.1
Moda	388.6	-12680.4
Desvío típico	183.9	5568.9
Mínimo	388.6	-12680.4
Máximo	1285.0	17457.9

¹ La Paz, 3600 m.s.n.m.; ² a nivel del mar
ppm: partículas por millón.

Ahora bien, habiendo protegido las condiciones reales en las que nos desenvolvemos, de

circunstancias de posible contaminación, para el caso de muestras de saliva, que fueron analizadas por dos equipos FTIR, en diferentes lugares y tiempos, se ha encontrado resultados variados, a saber:

1. La determinación de enriquecimiento por deuterio medida en un equipo FTIR-Jasco (La Paz, en altitud) nos ha dado resultados aceptables y comprensibles en su gran mayoría. Determinaciones que fueron realizadas a poco tiempo de concluir el trabajo de campo.
2. En una segunda medición, realizada en el exterior, en laboratorio a nivel del mar de estas muestras en un equipo FTIR-Affinity, nos ha dado en una mayoría de muestras, valores de enriquecimientos con deuterio muy elevados, de hasta 4, 6 o 10 veces más de lo analizado en una primera etapa en La Paz.

Previo a la reflexión sobre los resultados arriba presentados, pasaremos a dar más información sobre la contaminación que han demostrado dos muestras de saliva de nuestros escolares en la segunda medición de las mismas.

CONTAMINACIÓN DE MUESTRAS: Resultados de cultivos.

Es posible la “contaminación” por microorganismos en muestras de saliva de sujetos de estudio, en los que se utilizó el óxido de deuterio para medir el agua corporal total de los mismos. Ante esta posible situación, se decidió realizar el cultivo de las muestras que retornaron de nivel del mar, que estaban disponibles en nuestro laboratorio.

Se ha elegido dos muestras de saliva post dosis de deuterio. Ambas correspondían a escolares que presentaban ambos, infección oral clínicamente demostrada y con valores de IL-6 elevados.

Los resultados obtenidos de los cultivos realizados se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Resultados de cultivo de muestras de saliva.

Sujetos	Tiempo de cultivo	Microorganismo
1. Varón	48 horas	Corynebacterium spp
2. Varón	48 horas	Corynebacterium spp

Se interpretó la presencia de un microorganismo

no patógeno como el *Corynebacterium* spp, y por lo tanto no se realizó el antibiograma correspondiente.

Los ejemplos que hemos tenido en nuestro laboratorio, nos hacen realizar diferentes reflexiones. Una de ellas es que ambas circunstancias, tanto la evaporación como la contaminación pueden interferir en el análisis de muestras de saliva.

En el cuadro 4, se muestran datos de los análisis realizados en muestras de saliva de escolares. Se debe resaltar que los valores analizados de enriquecimiento en nuestro laboratorio en La Paz no superaban las 1285 ppm como valor máximo, y los valores de enriquecimiento analizados tiempo después a nivel del mar, fueron de hasta 17347 ppm como valor máximo.

¿Por qué pudo producirse este fenómeno?

Ante valores incrementados de deuterio, se podría pensar que era debido a la contaminación de estas muestras con deuterio. En el laboratorio donde se las analizó en 2da. instancia, se fueron despejando una a una las posibilidades de que hubiese habido contaminación con deuterio. En última instancia, se analizó que debido al viaje de alrededor de 16 horas, sin refrigeración de las muestras, podría haber favorecido el incremento de crecimiento de bacterias o moho en las muestras de saliva de nuestros escolares.

Asociado a lo anterior, las reflexiones sobre el tema a nivel del mar, estimaban que era posible que los microorganismos que se hubieran incrementado en las muestras de saliva, hayan generado **ácidos orgánicos** que pudieran interferir con el espectro infrarrojo del Oxido de Deuterio, y por ello mostraban valores muy elevados, en la mayoría de los casos, situación no fundamentada directa o indirectamente por bibliografía alguna en ese momento.

Lo anterior, desde cierto posicionamiento, puede relativamente tener en parte lógica, ya que la presencia de bacterias debería generar agua metabólica, según lo especificado en normas internacionales sobre el Uso de Isótopos Estables, el agua diluiría al isótopo y daría resultados reducidos de enriquecimiento. Sin embargo, es una situación que no se ha verificado en estas

muestras, más al contrario, se obtuvieron en la mayoría resultados con incrementos muy elevados de enriquecimiento (Cuadro N° 4).

En la **búsqueda de respuestas** al respecto, se ha podido recoger una publicación del Premio Nobel de Medicina, en 2008, Prof. Luc Montagnier, ganado por el descubrimiento del HIV, la misma trata sobre: las **ondas electromagnéticas** que emanan de ADN altamente diluido de varios patógenos. El describe a las ondas como **señales** que pueden revelar el origen bacteriano o viral de muchas condiciones patológicas como la enfermedad de Autismo o del Alzheimer.

El Prof. Montagnier (16) remarca el conocimiento sobre la "**memoria del agua**", porque puede mantener por períodos prolongados de tiempo a estas "señales". Así mismo, revela que es importante un nuevo movimiento científico que permita entrecruzar ciencias como la medicina, la física y la biología. El principal tópico a estudiar podría ser el fenómeno de la producción de ondas electromagnéticas por el ADN en el agua.

El equipo del Prof. Montagnier, ha encontrado que el ADN produce cambios estructurales en el agua, que persisten aún a muy altas diluciones, y que podría dirigir hacia la producción de señales electromagnéticas que pueden ser medidas. Así mismo indica, que no todo ADN produce señales que pueden ser detectadas con sus aparatos, reafirma que las señales de alta intensidad provienen del ADN bacteriano y viral. Estas señales fueron detectadas a partir del ADN de bacterias en el plasma de muchos enfermos de Autismo, de pacientes con Alzheimer, con Parkinson, y las bacterias detectadas provenían del tubo digestivo.

El Prof. Montagnier, insiste en que las ondas electromagnéticas son un **Biomarcador** para detectar la presencia de bacterias y su equipo de investigación es capaz de identificar a las bacterias a través de técnicas semejantes a la de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, técnica in vitro utilizada para ampliar enzimáticamente una región determinada de ADN). Además, indica que el problema en determinados momentos es que la reproductibilidad de los resultados no siempre es del 100%.

En un documento previo, bajo el título de

"Señales electromagnéticas son producidas por nanoestructuras acuosas derivadas desde las secuencia de ADN bacteriano", el mismo autor, indica que existe una nueva propiedad del ADN, resaltando la capacidad de la secuencia de ADN de algunas bacterias de inducir ondas electromagnéticas a altas diluciones acuosas. También establece que el ADN genómico de muchas bacterias patógenas contiene secuencias que podrían ser generadoras de tales señales. Concluye que se abre un nuevo camino para el desarrollo de la detección altamente sensitiva de infecciones bacterianas crónicas de enfermedades en humanos.

En otra publicación, indica que las señales electromagnéticas de baja frecuencia han demostrado ser producidas durante largo tiempo en dilución acuosa en ADN de virus de la Inmunodeficiencia Humana. En vivo, señales de ADN de HIV son detectadas solamente en pacientes tratados previamente con terapia antiretroviral y en los que no se ha detectado copias de ARN viral en la sangre (17). Lo cual indica un modo de replicación que implica solamente al ADN.

En esta línea de identificación del ADN bacteriano en el agua, se ha publicado trabajos relacionados con los fluidos usados para la hemodiálisis, demostrándose en los mismos que existen fragmentos de ADN bacterianos, y que estos contienen Citosina y Guanina no metilados en las bacterias a diferencia de los humanos, y que pueden inducir la inflamación a través de los monocitos y linfocitos a partir de la inmunidad innata y el incremento de interleucinas como el caso de la IL-6, que refuerza la presencia de señales a las que responde el sistema inmune. Así mismo, se ha podido demostrar una estimación de los niveles de ADN bacteriano necesarios para lograr cambios pro-inflamatorios, como los describe Schindler et al, en cultivos de células mononucleares de humanos, que requieren 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para incrementar la producción de IL-6, que reafirmaría las escasas cantidades necesarias de ADN para generar señales (19).

Reflexionando más sobre el tema, pareciera que esta información puede ser parte de la respuesta que estamos buscando sobre los resultados

que tenemos en relación al enriquecimiento de deuterio en saliva de nuestros escolares.

Un primer análisis nos debe llevar a indicar que en la mayoría de los escolares estudiados ha existido presencia de infecciones orales que fueron identificadas clínicamente, 86.9 % con infecciones (n=84), a través de una revisión pediátrica exhaustiva de la cavidad oral, nasal, faríngea y de oído en los escolares.

En la **primera medición** de deuterio en saliva (La Paz), no se verifican valores extremos de enriquecimiento, ello podría estar asociado a que el crecimiento bacteriano al ser mínimo, por la conservación adecuada de las muestras, no interfería con la medición del enriquecimiento de deuterio en saliva. Las bacterias y/o sus componentes como el ADN, no habrían generado en la mayoría de los casos interferencia con el análisis del óxido de deuterio.

En la **segunda medición**, en otro laboratorio, debido al tiempo transcurrido de viaje, sin la refrigeración adecuada de estas muestras, y con temperaturas ambientales más elevadas, todos estos factores pudieron generar la posibilidad de crecimiento de un mayor número de bacterias, y probablemente exposición de secuencias de ADN bacteriano en las muestras de saliva que fueron analizadas a nivel del mar, evidentemente no en todos los casos.

Este **documento de reflexión científica**, tiene el propósito de buscar el planteamiento de fundamentos que identifiquen una o varias hipótesis como respuesta a los valores de enriquecimiento de deuterio muy elevados encontrados en algunas muestras de saliva en nuestros escolares. Es evidente que no ha podido lograrse el adecuado fundamento para comprender el fenómeno que hemos vivido con estas muestras de saliva, porque solo se ha alcanzado un nivel de reflexión científica y no así un nivel de ensayo científico. Sin embargo, sí se puede obtener lecciones que nos ayuden a mejorar el proceso de medición de muestras de saliva con isótopos estables, como el caso del óxido de deuterio.

La descripción del Prof. Montagnier, relacionada a las ondas electromagnéticas, es un muy buen argumento, bajo una concepción de conocimiento científico de alto nivel, para avanzar a futuro en el

campo de mayor integración de la medicina, la biología y la física, con sus implicancias futuras, que muchos debieran apropiarse y valorar para mejorar la calidad de vida. También es importante tomar en cuenta el tipo de equipos de medición, no siendo lo mismo un equipo de FTIR que un equipo de Espectrometría de Masas de Relación Isotópica (IRMS), siendo este más sensible, para la medición del enriquecimiento en deuterio en la saliva.

Aunque busquemos diferentes argumentos para comprender lo vivido, como siempre en ciencia, debemos ser pacientes y persistentes en nuestras preguntas e hipótesis científicas en el transcurso del tiempo y más en un contexto difícil como el caso de la biología y fisiología de altitud. El interrogatorio a la naturaleza es muy complejo, más aún cuando la precisión de nuestras mediciones no son tan integrales y complementarias como para poder comprender estos procesos. Desde ya debemos incluir el componente bioético en investigación científica que nos permita realizar diseños que nos aclaren científicamente estos procesos.

¿Que se ha aprendido y que se recomienda?

Las muestras de saliva de nuestros pacientes deben ser obtenidas en las mejores condiciones de higiene, por sobre todo oral, para lograr una mínima carga bacteriana. La muestra basal, tomada en las primeras horas de la mañana, requiere la confirmación de haber sido tomada con una higiene oral previa a la toma de muestra de saliva.

La muestra post dosis de deuterio, que habitualmente es tomada después de 3 horas y hasta 4 horas, debe ser en la que más se cuida la higiene oral, debido a que durante ese período post dosis de deuterio puede haber un crecimiento bacteriano a nivel oral. Debemos tomar en cuenta este aspecto para evitar tomas de muestras de saliva con contenido bacteriano "incrementado", que a la larga, sea por la espera del análisis de las muestras en su propio laboratorio, por la aparición de desperfectos en el sistema de refrigeración, o por el transporte de muestras a otro país, pudiera favorecer el crecimiento bacteriano y por ende dar errores en el cálculo del ACT del sujeto estudiado.

Esta consideración, tiene grados de analogía, por ejemplo, con lo establecido en la toma de muestras

de orina para cultivo y antibiograma, ante la sospecha de infección. Una de las consideraciones para esta toma de muestra, establece que se debe tomar la muestra “a chorro medio”, con el propósito de minimizar la presencia de microorganismos que “confundan” los resultados del cultivo futuro de una muestra de orina. En ese sentido, para el análisis de muestras de saliva enriquecidas con deuterio que permite determinar la composición corporal u otros, se recomienda que el sujeto de estudio realice una higiene oral previa a la muestra de saliva, máximo si entendemos que nuestro

trabajo de investigación se ejecuta en una ciencia que no es exacta.

Con el sentir y el propósito de, “hacer bien” para “servir bien” a nuestra sociedad, se resalta la gran utilidad e importancia de las técnicas isotópicas estables, revelándose a futuro sus impactos en el campo de la salud en poblaciones vulnerables. Se aprecia a los colegas y lectores que pudieran obtener algo más de información y conocimiento sobre el tema a partir de este trabajo en nuestro contexto de altitud, u otros contextos.

REFERENCIAS

1. Lifson N, Gordon G, Mc clintock R. Measurements of total carbon dioxide production by means of D¹⁸O. *J Appl Physiol* 1955; 7: 704-710.
2. Parker L, Reilly JJ, Slater C, et al. Validity of six field and laboratory methods for measurement of body composition in boys. *Obes Res* 2003;11:852-858.
3. Wells JCK, Fewtrell MS. Measurement body composition. *Arch Dis Child* 2006;91:612-617.
4. San Miguel S. JL. Metabolismo de proteínas en niños residents de gran altitud: Estudio piloto sobre la utilización de técnicas con isótopos estables. *Scientifica* 2007; 5: 5-13.
5. San Miguel JL, Spielvogel H, Berger J, Araoz M, Lujan C, Tellez W, Caceres E, Gachon P, Coudert J, Beaufriere B. Effect of high altitude on protein metabolism in Bolivian children. *High Altitude Medecine & Biology* 2002, 3: 377-386.
6. Coward WA, Cole TJ, Sawyer MB, et al. Breast-milk intake measurement in mixed-fed infants by administration of deuterium oxide to their mothers. *Hum Nutr Clin* 1982;36C:141-148.
7. Blagojevic N, Allen BJ, Gaskin KJ, Baur LA. Determination of total body water by Fourier transform infrared analysis. *Australas Phys Eng Sci Med* 1990;13:110-6.
8. Jennings G, Bluck L, Wright A, Elia M : The Use of Infrared Spectrophotometry for Measuring Body Water Spaces *Clinical Chemistry* , 1999 ; 45(7) : 1077-1081
9. San Miguel JL. Salud y Tecnología nuclear a gran altitud. *SCIENTIFICA* 2010 ; 8: 30-32.
10. Schloerb, Friis-Hansen, Edelman, Solomon, Moore. The Measurement Of Total Body Water In The Human Subject By Deuterium Oxide Dilution With A Consideration Of The Dynamics Of Deuterium Distribution *Biophysical Lab. Harvard Medical School, 1950 June 26* : 1296-1310.
11. Katz, J 1965. Chemical and biological studies with deuterium. *Estudios químicos y biológicos con el deuterio. 39th Annual Priestly Lecture, Pennsylvania State University, University Park, Pa* : 1-110.
12. Lukaski HC, Johnson PE, A simple, inexpensive method of determining total body water using a tracer dose of D₂O and infrared absorption of biological fluids *The American Journal of Clinical Nutrition* 1985 Feb;41: 363-370.
13. Westerterp KR: Body composition, water turnover and energy turnover assessment with labeled water. *Proc Nutr Soc* 1999; 58: 945- 951.
14. Lukaski HC, Johnson PE, A simple, inexpensive method of determining total body water using a tracer dose of D₂O and infrared absorption of biological fluids *The American Journal of Clinical Nutrition* 1985 Feb;41: 363-370.
15. Montagnier L. Newsmaker Interview, *Science*, december 2010, vol 330:1732.

16. Montagnier L. *Electromagnetic signals are produced by aqueous nanostructures derived from bacterial DNA sequences. Interdiscip Sci. 2009 Jun;2:81-90.*
17. Montagnier L. *Electromagnetic detection of HIV DNA in the blood of AIDS patients treated by antiretroviral therapy. Interdiscip Sci. 2009 Dec;4:245-53.*
18. Handelman GJ, Megdal PA, Handelman SK. *Bacterial DNA in water and dialysate: Detection and significance for patient outcomes. Blood Purif 2009;27:81-85.*
19. Schindler R, Beck W, Deppisch R, Aussieker M, Wilde A, Gohl H, Frei U. *Short bacterial DNA fragments: detection in dialysate and induction of citokines. J Am Soc Nephrol 2004;15:3207-3214.*