

## EVALUACIÓN DE LA TRANSMETILACIÓN EN MEMBRANA EN EL SÍNDROME PREMENSTRUAL

Patricia Tabacchi Bolívar<sup>1</sup>

### RESUMEN

La reacción de transmetilación lipídica consiste en la síntesis de fosfatidilcolina (PC) a partir de fosfatidiletanolamina (PE), incorporando tres grupos metilo donados por S-adenosilmetionina (SAME). Esta reacción ha sido descrita en la membrana plasmática y en el retículo endoplásmico, y ocurre por la acción de la fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa y la fosfatidil N-metiletanolamina-N-metil transferasa. El interés de estudiar esta actividad enzimática deriva de la observación de una menor proporción de PC en las membranas de eritrocito de mujeres con síndrome premenstrual (SPM) durante la fase luteal tardía (FLT) del ciclo menstrual, y de los reportes del empleo de SAME para el tratamiento del SPM. El estudio piloto de la actividad de transmetilación en 4 mujeres con SPM y 4 mujeres control, mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la cantidad de PC formada con respecto al grupo control en la fase luteal. Los resultados confirman los estudios preliminares hechos por nuestro grupo y refuerzan la hipótesis que la vía de la transmetilación lipídica sería de importancia para comprender la etiología del SPM.

**Palabras clave:** Transmetilación, Fosfatidilcolina (PC), Fosfatidiletanolamina(PE), S-adenosilmetionina (SAME), Síndrome Premenstrual.

### SUMMARY

The lipid transmethylation reaction consists in the synthesis of phosphatidylcholine (PC) through the addition of 3 methyl groups from S-adenosyl-L-methionine (SAME) to phosphatidylethanolamine (PE). This reaction is known to take place in the plasma membrane and the endoplasmic reticulum, and is catalyzed by phosphatidylethanolamine N-methyl transferase and phosphatidyl N-methyl ethanolamine-N-methyltransferase. Our interest in investigating this enzymatic activity was raised by the previously reported lower proportion of PC in membranes of erythrocytes from women with Premenstrual Syndrome (PMS) during the Late Luteal Phase (LLP) of the menstrual cycle, as well as the use of SAME for the treatment of PMS. The study showed significant difference ( $p < 0.05$ ) between 4 women with SPM and 4 control women with regard to their transmethylation activity expressed as the amount of PC formed in the Luteal Phase. The results confirm those from previous studies and reinforce the hypothesis that the lipid transmethylation pathway is implicated in the etiology of PMS.

**Key words:** Transmethylation, Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylethanolamine (PE), S-adenosyl-L-methionine (SAME), Premenstrual Syndrome (SPM).

### INTRODUCCIÓN

Desde hace más de 50 años se sabe que la membrana plasmática está compuesta por lípidos y proteínas que se disponen formando una bicapa organizada a través de interacciones no covalentes. La forma como estos componentes se disponen y cómo interactúan se encuentra bien explicada en el modelo del "Mosaico fluido" propuesto por Singer y Nicholson (1972), (Singer, 1992).

Las membranas biológicas son más que simples divisiones de compartimentos celulares, cuentan con

mecanismos que facilitan el transporte selectivo de sustancias de un lado a otro de la membrana, y presentan receptores que se unen a ligandos específicos en el espacio externo mediando la transmisión de información hacia el interior de la célula o bien mediando la transmisión de información entre célula y célula (Kohwein, 1992; Mathews, 2002; Nelson & Cox, 2000; Stryer, 1990).

Los fosfolípidos son constituyentes esenciales de las membranas no sólo desde el punto de vista estructural (forman la bicapa lipídica), sino también funcional, influyen en la fluidez de la membrana y generación de

<sup>1</sup> Escuela Académico Profesional de Ciencias Veterinarias. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma.

segundos mensajeros (Hirata & Axelrod, 1980; Nelson & Cox, 2000).

Entre los fosfolípidos más abundantes en las membranas se encuentran la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE), la fosfatidilserina (PS), el fosfatidilinositol (PI) y la esfingomielina (SM), los mismos que se encuentran asimétricamente distribuidos en la membrana plasmática (Nelson & Cox, 2000; Mathews, 2002).

Los procesos de biosíntesis y modificación de los fosfolípidos en la bicapa ocurren en diferentes compartimentos celulares pero siempre asociados a membranas. La mayoría de las vías biosintéticas de lípidos ocurren en la membrana de retículo endoplásmico liso, y sus modificaciones como la glicosilación, en la membrana del aparato de Golgi. También pueden ocurrir modificaciones a nivel de la membrana plasmática, en la cual existen enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis, de intercambio de cabezas polares o de cadenas de ácidos grasos, o modificaciones de cabezas polares a través de reacciones de transmetilación (Marggrafwd, 1981; Luberto & Hannun, 1989; Roberts, 1994; Nelson & Cox, 2000).

**ANTECEDENTES**

**Fosfolípidos y Transmetilación en Membranas:** Según lo que se conoce hasta el momento, la modificación de las concentraciones de PE y PC en la membrana de eritrocito puede originarse por el transporte de lisofosfatidilcolina o lisofosfatidiletanolamina por la albúmina desde la región extracelular al interior de la membrana; por una reacción de intercambio de PC extracelular con PC de la membrana realizada por las lipoproteínas; por la transmetilación de PE a PC o por la hidrólisis de cualquiera de ellos mediada por fosfolipasa A2.

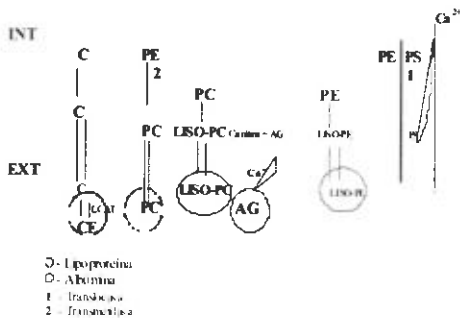


Figura 1. Esquema de los mayores cambios de los componentes lipídicos en membranas de eritrocito maduro (modificado en base a Percy 1988).

Estudios de Hirata y Axelrod muestran que la transmetilación de PE a PC tendría un rol importante en los mecanismos de transducción de señales mediada por

receptores y esto podría deberse a modificaciones en la fluidez de membrana del microambiente del receptor (Hirata & Axelrod, 1979a, 1980)

La transmetilación es una reacción esencial para muchos procesos bioquímicos en la célula. Esta reacción es catalizada por una familia de enzimas conocidas como "metiltransferasas" e involucra la transferencia de grupos metilo activados desde una molécula donadora llamada S-Adenosilmetionina (SAME) hacia diversas moléculasceptoras tales como aminos biogénicas, fosfolípidos, proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y porfirinas (Stryer, 1990; Maher, 2000; Nelson & Cox, 2000; Bottiglieri, 2002; Mathews, 2002).

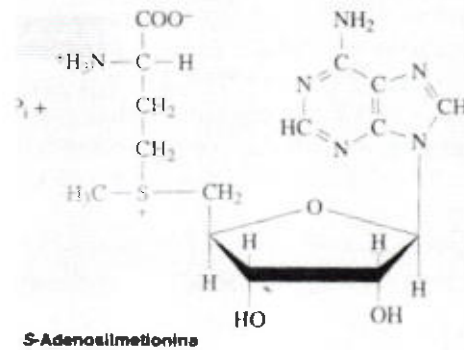


Figura 2. Estructura de la S-adenosilmetionina (Stryer 1990).

La vía de transmetilación de PE ha sido ampliamente estudiada a nivel de hepatocitos, principalmente en membranas de retículo endoplásmico y microsomas (Cui & Vance, 1993; Cui & Houweling, 2002; García-Trevijano, 2000; Gibson & Wilson, 1961; Hirata & Axelrod, 1979; Kakimoto, 1992). Se ha establecido que la biosíntesis de PC es esencial para la función hepática y un 30% de esta especie lipídica proviene de la actividad de la transmetilación. En estos estudios se ha descrito el mecanismo de esta vía, el cual consiste en la conversión del fosfolípido fosfatidiletanolamina (PE) al fosfolípido fosfatidilcolina (PC) como producto final tras la incorporación de tres grupos metilo.

El mecanismo involucra la formación de los productos intermedios metilados Fosfatidilmonometiletanolamina (PME) y Fosfatidildimetiletanolamina (PDE). La secuencia de reacciones es la siguiente: conversión de PE → PME, reacción que es catalizada por la enzima Fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (E.C.2.1.1.17); y la conversión de PME → PDE → PC, siendo estas dos últimas reacciones consecutivas catalizadas por la enzima Fosfatidil N-metiletanolamina N-metiltransferasa (E.C.2.1.1.71), Hirata & Axelrod, 1979, Lew & Hockaday, 1988.

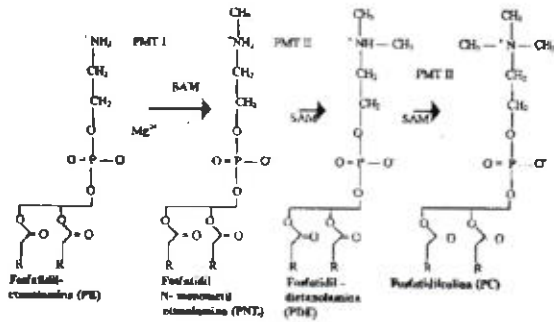


Figura 3. Mecanismo propuesto para la reacción de transmetilación de PC a PE a nivel de membrana. (tomado de Hirata 1980.)

Hirata y colaboradores han demostrado la actividad de transmetilación de PE a PC en membrana de eritrocito, proponiendo el mismo mecanismo descrito anteriormente y estableciendo que la primera metilación se llevaría a cabo en la monocapa interna (citoplasmática) de la membrana y la segunda y tercera metilación en la monocapa externa. Además postulan que la asimetría en la distribución de los sitios catalíticos facilitaría la metilación en etapas de la Fosfatidiletanolamina, a la vez que promovería una traslocación del producto final Fosfatidilcolina a la monocapa externa (Gibson & Wilson, 1961; Hirata & Axelrod, 1978a, 1978b, 2000).

**Transmetilación y Estados de Ánimo.**

Desde hace algunos años SAME ha sido empleado en la terapia de desórdenes afectivos o de conducta tales como depresión, manía y esquizofrenia, con resultados bastantes satisfactorios, especialmente en aquella población que no tolera los antidepresivos convencionales (tricíclicos y SSRIs). (Donna, 1986, Baldessarini, 1987, Bressa, 1994).

Alrededor de los años 80, Cantoni y colaboradores postularon una hipótesis con respecto a las bases moleculares de estos desordenes afectivos. Según esta hipótesis la acción antidepresiva de SAME estaría basada en su capacidad de metilar ciertos compuestos en el sistema nervioso central. Uno de esos compuestos fue llamado por él Barinine (que estudios posteriores lo identifican como PE), el cual por acción de SAME se convierte en metilbarinine (que actualmente ha sido identificado como PC) (Drouva & Laplante, 1986; Gibson & Wilson, 1961). Esta hipótesis ha sido corroborada por estudios posteriores que señalan, por ejemplo, que la actividad de Metionina Adenosin transferasa (MAT, enzima que sintetiza SAME) cuantificada al medir los niveles de SAME en sangre (Connor & Gillum, 1990; Bottiglieri, 2000), estaría disminuida en la depresión y significativamente aumentada en manía. También se ha detectado bajos niveles de SAME en líquido cefalorraquídeo de pacientes con esquizofrenia (Matcheri & Kashavan, 1993; Ryzantera, 2002)

Otros reportes señalan cambios en la composición lipídica de la membrana de eritrocitos de pacientes con desórdenes afectivos, como por ejemplo una disminución de PE en esquizofrénicos con respecto al grupo control (Schimt, 1998), así como también un aumento de PE y disminución de PC en el trastorno conocido como **Síndrome Premenstrual (SPM)**, (De Jong & Rubinow, 1985; Gallo & Polettii, 1993).

Se sabe también que la síntesis de SAME esta íntimamente ligada al metabolismo del folato y la vitamina B12, y que la deficiencia de estas vitaminas reduce los niveles de SAME en el sistema nervioso central y causaría disturbios neurológicos similares en depresión, manía y esquizofrenia (Bottiglieri, 1974; Carney, 1987; Carney, 1987; Connor & Gillum, 1990; Morrison, 1996; Bottiglieri, 2000; Bottiglieri, 2002). Todo esto estaría asociado a cambios en la fluidez de membrana ya que se ha establecido que SAME ayuda a mantener la relación PC/Colesterol en membrana neuronal (Bottiglieri, 2002), promoviendo de esta manera una mejor recepción y procesamiento de la señal hormonal, neurotransmisora y eléctrica (Strittmatter et al, 1979; Strementinoli, 1987; Tavoni, 1987; Mathews, 2002). La mejora del estado de ánimo ante el suministro de SAME estaría también relacionada al incremento de la actividad dopamina/serotonina y a la selectiva acción excitatoria sobre las neuronas de la región cortical del cerebro (Baldessarini, 1987; Strementinoli, 1987; Bottiglieri, 2000).

**El Síndrome Premenstrual y su posible relación con la Transmetilación Lipídica:**

Se define como **Síndrome Premenstrual (SPM)** a la recurrencia cíclica en la Fase Luteal del ciclo menstrual de una combinación de síntomas físicos, psicológicos y conductuales, lo suficientemente severos como para causar un deterioro de las relaciones interpersonales o interferir con las actividades normales (American Psychiatric Association, 1987; Freeman, 2003; Reid, 1987).

La incidencia del SPM en la población femenina se estima entre un 30 a un 40% de las mujeres en edad reproductiva entre los 20 y los 40 años, y particularmente en mujeres que tienen un hijo o historia de depresión en sus familias (Freeman, 2003; Steiner, 2003).

Los criterios clínicos para diagnosticar el SPM están establecidos en el DSM-III-R, manual de diagnóstico editado por la Sociedad de Psiquiatría de los EEUU (American Psychiatric Association, 1987).

El diagnóstico de Síndrome Premenstrual se da a aquellas personas que presentan ciertos grupos de síntomas durante la Fase Luteal en tres ciclos menstruales consecutivos y que típicamente empiezan a

disminuir días después de iniciada la fase folicular del ciclo menstrual. Las bases moleculares del SPM no están bien definidas, pero existen evidencias que lo asocian a cambios hormonales dentro del ciclo menstrual (Backstrom, 1983; Drouva & Laplante, 1986; Facchinetti & Genazzari, 1993; Gallo, 1995) y anomalías en el sistema de traducción de señales (Hirata & Axelrod, 1979; Habori, 1995). En estudios no publicados de nuestro grupo de investigación (Gallo & Polettii, 1993) se observó un cambio en la composición de fosfolípidos de membrana durante la fase Luteal del ciclo menstrual asociado a un incremento de PE y una disminución de PC en mujeres con SPM con respecto al control. Además, el empleo de SAME en el tratamiento del SPM conjuntamente con el suministro de ácidos grasos, sugiere que la transmetilación de lípidos de membrana podría ser un factor importante en la etiología del Síndrome Premenstrual (De Jong & Rubinow, 1985; Mortola, 1998).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales:

**Reactivos:** Las sales y los estándares de fosfolípidos así como los solventes fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. Los compuestos radioactivos fueron obtenidos de New England Nuclear.

**Sujetos:** Para la evaluación se contó con dos grupos de mujeres voluntarias con ciclos menstruales regulares de 28 días:

**Grupo SPM,** cuyo diagnóstico psiquiátrico las calificó como SPM (+); el diagnóstico fue confirmado con un cuestionario a través del cual se evaluó su estado depresivo, ansiedad, susceptibilidad afectiva e irritabilidad a lo largo de tres ciclos menstruales completos.

**Grupo Control,** conformado por mujeres calificadas de no padecer ningún desorden psiquiátrico.

Las personas participantes en esta etapa estuvieron en un rango entre los 18 y los 40 años de edad.

### Muestras:

Se obtuvieron dos muestras de sangre: un tubo con 10 mL usando como anticoagulante heparina.

Las muestras fueron tomadas en dos fases del ciclo menstrual: Fase Folicular Temprana (de 0 a 5 días) y Fase Luteal Tardía (de 24 a 28 días).

## MÉTODOS:

### 1. OBTENCIÓN DE FANTASMAS DE GLÓBULO ROJO

#### Reactivos:

a. Buffer Tris (310 mM) pH 7,6 (buffer isotónico): el Tris es preparado y llevado a pH 7,6 con HCl.

b. Buffer Tris (20 mM) pH 7,6 el cual se prepara por dilución de una alícuota de buffer Tris 310 mM.

#### Procedimiento:

Se centrifugó la sangre heparinizada (10 mL) a 1000 g

por 30 min. a 4 °C, se removió el plasma por succión y se resuspendió el paquete globular en buffer Tris 310 mM. Se mezcló por inversión y se centrifugó la muestra nuevamente en las condiciones antes descritas.

Se removió el sobrenadante sacrificando un poco de células rojas para remover la capa. Se repitió el lavado 2 veces más.

Las células fueron suspendidas en buffer isotónico a un hematocrito de 50%. La muestra fue mezclada por inversión por 1 min. antes de tomar el hematocrito.

### Preparación de membranas:

Una alícuota de 5 mL de suspensión celular fue hemolizada con buffer Tris 20mM pH 7. Se agitó en vortex por 5 min. Se centrifugó luego a 20,000 g por 20 min. a 4 °C (verificando hemólisis).

Se prosiguió con 3 a 4 lavados hasta verificar la claridad de las membranas.

Después de remover el último lavado, las membranas fueron suspendidas en buffer Tris 310 mM y trasferidas a un vial con pipetas Pasteur.

### 2. OBTENCIÓN DE MEMBRANAS INVERTIDAS (Lew & Hockaday, 1988; Method in Enzymology, 1974)

**Reactivos:** Solución 0,5P8: 0,5 mM de fosfato de sodio pH 8. Una solución stock de 0,1 M de fosfato de sodio (pH 10) es diluida 200 veces.

**Procedimiento:** Una alícuota de 0,1 mL de fantasmas de glóbulo rojo fue diluida en 4 mL de solución 0,5P8, se agitó en vortex por 30 seg y fue colocada en frío por 1,5 horas. Luego la suspensión fue centrifugada a 28 000 g por 30 min. Las membranas recuperadas fueron suspendidas en 0,5 mL de solución 0,5P8, agitadas en vortex y pasadas 3 veces a través de una aguja No 27 en una jeringa de 1 mL para completar la vesiculación.

### 3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de proteínas en las membranas se realizó empleando el Kit BIO-Rad DC basado en el método de Lowry -Bradford (Lowry, 1951; Bradford, 1976).

### 4. ENSAYO DE TRANSMETILACIÓN (Hirata & Axelrod, 1978b; Percy & Schemell, 1988)

#### Medio de reacción

Se emplea SAME tritiado (S-adenosil-L-metil 3H metionina). Buffer Tris -HCl 50 mM, conteniendo 5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 mM de cisteína, pH 8.

SAME 1 mM (1 μCi) (la concentración final se obtuvo trabajando con una mezcla de SAME tritiado y SAME no radioactivo).

**Preparado de membranas:** No Invertidas e Invertidas



en concentración equivalente a 800 ug de proteínas (la reacción fue corrida para cada modelo de membrana).

Volumen de trabajo 1000 L.

Este Sistema B fue aplicado para la evaluación de la transmetilación de PE a PC en el Síndrome Premenstrual.

**Procedimiento**

Los sistemas de reacción en los cuales se usó SAME radioactivo fueron sonicados por 5 minutos con un sonicador de baño, modelo Ultrasonic 2000 Branson. Luego se realizó una preincubación por 16 horas a 4o C con agitación constante. Se consideró un Tiempo cero (to) de 5 min. de incubación a 25o C después del cual se retiró una alícuota de 500 L y se detuvo la reacción con 1,1 mL de isopropanol para proceder a la extracción lipídica. Este tiempo cero (to) sirvió de control de las concentraciones basales de los fosfolípidos de transmetilación y esfingomielina. Luego se siguió incubando por un tiempo de reacción (tf) de 30 min. a 37 oC. Una vez transcurrido el tiempo se detuvo la reacción con 1,1 mL de isopropanol para proceder luego a la extracción lipídica.

**5. EXTRACCIÓN LIPÍDICA** (Rose, 1965; Morris, 1986).

Se realizó con una mezcla de isopropanol cloroformo bajo gas de nitrógeno grado cromatográfico.

**6. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC) PARA LA IDENTIFICACION DE LOS FOSFOLÍPIDOS PE; PME; PDE; PC Y SM** (Hirata & Axelrod, 1978a; Morris, 1986; Percy, 1988).

**Materiales y Reactivos:**

Placas de TLC silica gel G-60 en base de vidrio 20x20 marca Merck.

Acetona, cloroformo, hexano, n-propilalcohol, ácido propiónico (g.r.), agua tipo I.

Cámaras de revelado, pipetas Hamilton de 10 L, estándares de Fosfolípidos PC, PE, PDE, PME y SM, marca Sigma.

Se usaron como sistemas de corrida:

Sistema 1: acetona-hexano (1:3)

Sistema 2: n-propilalcohol-ácido propiónico-cloroformo-agua (3:2:2:1).

**Tinción:**

La tinción de placas se realizó con vapores de yodo.

**Procedimiento**

Se colocó la placa de TLC en el interior de una cámara de revelado que contenía 0,5 g de yodo sublimado. Se cerró la cámara y se dejó revelar por 30 min. Luego, con un lápiz se delinearón las manchas detectadas tanto en la muestra y los estándares a fin de determinar su Rf y permitir su posterior raspado y transferencia a los

viales de vidrio para cuantificar la muestra por centelleo líquido. Los viales de vidrio de 5 mL de capacidad contenían 1 mL de líquido de centelleo para la realización de las lecturas en el instrumento Beckmann LS 6500 Multi-purpose.

**7. FÓRMULAS EMPLEADAS:**

Para expresar la cuantificación de la formación de cada intermediario fosfolípido de transmetilación y esfingomielina en los ensayos realizados en esta investigación se empleó la siguiente fórmula:

Cambio con respecto al basal = (D.O final - D.O inicial).

Esta fórmula se aplicó para cada fosfolípido evaluado; considere que D.O significa densidad óptica.

$$\% \text{ de Cambio} = \left( \frac{\text{Cambio con respecto al basal}}{\sum \text{de cambios con respecto al basal de las especies evaluadas}} \right) \times 100\%$$

**8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis estadístico se usó el programa SPSS (Statcal Package for the Social Sciences) versión 11,5, considerando cálculos estadísticos descriptivos y comparación de medias. Para la comparación de medias se utilizó el Test de Student con un límite de confianza del 95%.

**RESULTADOS y DISCUSIÓN**

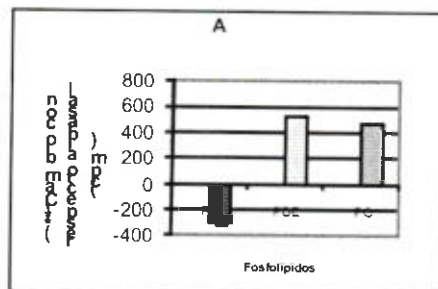
**Identificación de los intermediarios de transmetilación por TLC.**

Fosfatidiletanolamina (PE), Fosfatidilmonometiletanolamina (PME), fosfatidildimetiletanolamina (PDE) y Fosfatidilcolina (PC) fueron satisfactoriamente identificados a través de la técnica en cromatografía en capa fina unidimensional.

Se establecieron los Rf característicos para cada uno de los intermediarios:

| Intermediario lipídico | Rf   |
|------------------------|------|
| PE                     | 0,58 |
| PME                    | 0,53 |
| PDE                    | 0,42 |
| PC                     | 0,41 |

(A) Membranas No Invertidas



(B) Membranas Invertidas.

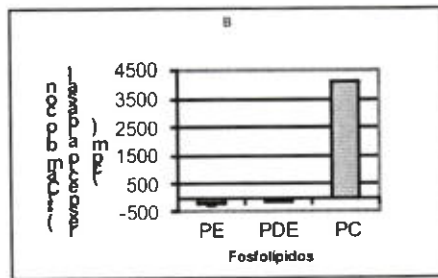


Figura 4. Evaluación comparativa de la transmetilación usando dos modelos de membranas: A) Membranas No Invertidas y B) Membranas Invertidas(\*).

En el diseño del modelo experimental es para la evaluación de la transmetilación se emplearon dos formas de fantasmas de eritrocitos. El llamado modelo "right out" (membranas No Invertidas), utiliza membranas de eritrocitos que conservan su constitución normal, es decir, su cara externa e interna correctamente dispuesta, mientras que el otro modelo llamado "inside out" (membranas Invertidas) utiliza membranas cuya cara interna está dirigida hacia el exterior. Estos modelos son empleados en el estudio de la función de las proteínas de membranas y su relación con la tasa recambio de los fosfolípidos (methods in Enzymology, 1974; Dugan, 1985; Lew & Hockaday, 1988; Connor & Gillum, 1990). Al observar las Figuras 4A y 4B se observa una mayor formación de PC en el modelo de membranas Invertidas. La respuesta permite entonces corroborar lo propuesto por Hirata & Axelrod, (1978b); Habori, (1995) y Hirata & Axelrod, (1979), quienes describen los posibles mecanismos de acción de las transmetilasas, estableciendo que este mecanismo involucra el paso de los sustratos de una enzima a otra, acompañado de un rearrreglo dinámico en la matriz de la membrana.

Al realizar un análisis comparativo de la formación de PE, PDE, PC y SM durante la Fase Folicular del ciclo menstrual, usando membranas Invertidas, se encontró que no existe diferencia significativa en la formación de estos lípidos entre el grupo de mujeres SPM y el grupo Control, tal como se aprecia en la Tabla 1 y se representa en la Figura 5.

De igual forma, empleando membranas Invertidas, se pudo apreciar una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en los niveles de Fosfatidildimetiletanolamina (PDE) durante la Fase Luteal de pacientes con SPM comparado con los controles, tal como se aprecia en la Tabla 2 y se representa en la Figura 6.

Asimismo, se realiza después un análisis comparativo de la formación de PE, PDE, PC y SM durante la Fase Folicular del ciclo menstrual, usando membranas No Invertidas. Esta evaluación mostró que no existe diferencia significativa en los niveles de formación de

estos lípidos entre el grupo de pacientes con SPM y el grupo Control, tal como se aprecia en la Tabla 3 y se representa en la Figura 7.

Cuando se realiza el análisis en la Fase Luteal del ciclo menstrual, usando también membranas No Invertidas, se estableció diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en los niveles de formación de Fosfatidilcolina (PC) y Esfingomielina (SM) entre el grupo de paciente con SPM y el grupo Control, tal como se aprecia en la Tabla 4 y se representa en la Figura 8.

Por otro lado se realizó luego un estudio comparativo de la formación de PE, PDE, PC y Esfingomielina (SM), entre la Fase Folicular y Luteal del ciclo menstrual de cada grupo evaluado por separado, mujeres con SPM y mujeres control, con la finalidad de ver si la reacción de transmetilación y formación de SM es igual o diferente durante ambas fases del ciclo menstrual en cada grupo.

Al realizar el análisis usando membranas Invertidas se observó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la formación de los niveles de Fosfatidilcolina (PC) al comparar la Fase Folicular y Luteal del ciclo menstrual en el grupo de mujeres con SPM, mientras que en el grupo control no existe diferencias significativa entre las fases, tal como se presenta en la Tabla 5.

De igual forma que en el caso anterior, el análisis comparativo fue realizado usando membranas No Invertidas, y se observó que no existe diferencia significativa entre la Fase Folicular y Luteal de mujeres con SPM, pero sí entre la Fase Folicular y Luteal en los niveles de formación de Fosfatidildimetiletanolamina (PDE) en el grupo de mujeres Control ( $p < 0.05$ ), tal como se presenta en la Tabla 6.

Nuestros resultados sugieren que existiría una posible relación entre la transmetilación lipídica que conduce a la formación de PC a partir de PE en la membrana plasmática y el Síndrome Premenstrual, ya que se han encontrado diferencias entre el grupo Control y en la cantidad de estos fosfolípidos presentes en la membranas en la Fase Luteal del ciclo menstrual.

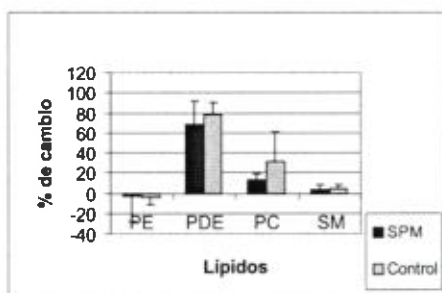
Así tenemos que en relación a la presencia de las especies de fosfolípido evaluada tanto en Fase Folicular y Luteal del ciclo menstrual (Figuras del 5 al 8), la diferencia entre ambos grupos queda establecida en la Fase Luteal del ciclo menstrual (Tablas 1 al 4), favoreciéndose la formación de Fosfatidildimetiletanolamina (PDE) y Fosfatidilcolina (PC) en controles con respecto al grupo con SPM en experimentos con membranas Invertidas y membranas No Invertidas respectivamente. Esta respuesta puede estar también relacionada con la naturaleza de los ácidos grasos asociados a los sustratos intermediarios de la reacción de transmetila-

ción que haría que se favorezca la formación de un determinado tipo de intermediario (Dugan *et al.*, 1985; Morrison, 1996; Freeman, 2003; Bottiglieri, 2000). Por otro lado, al contrastar los resultados obtenidos en las Fases Folicular y Luteal en cada grupo (Tablas 5 y 6) podemos observar que no existe diferencia significativa del grupo Control en relación a la concentración de PE, PDE, PC y SM al usar membranas Invertidas. Si se manifiesta una diferencia cuando se emplean membranas No invertidas, incrementándose la formación de PDE en la Fase Folicular. Esta respuesta puede deberse a que al usar membranas Invertidas podría haber afectado el entorno y la disposición natural de las transmetilasas para unirse con sus sustratos; pero lo más importante es que el grupo de mujeres con Síndrome Premenstrual no presenta diferencias significativas en la formación de PE, PDE, PC y SM entre las fases del ciclo menstrual cuando se usan las membranas No Invertidas, que son la forma bajo la cual trabajan en el organismo. La diferencia sólo se presenta en la formación de PC usando membranas Invertidas la cual se incrementa en la Fase Folicular, lo que sugiere que la enzima está afectada de alguna forma, ya sea por una disposición desfavorable de los sitios activos de las enzimas o por la naturaleza de sus sustratos en la Fase Luteal del ciclo menstrual.

**Tabla 1. Formación de PE, PDE, PC y SM en la Fase Folicular del ciclo menstrual usando membranas Invertidas(\*)**

|     | CASOS   | N | Media | Desviación Estándar | Sig. |
|-----|---------|---|-------|---------------------|------|
| PE  | SPM     | 4 | -2.7  | 25.37               | N.S  |
|     | control | 4 | -3.8  | 8.20                |      |
| PDE | SPM     | 4 | 67.9  | 23.45               | N.S  |
|     | control | 4 | 77.8  | 12.43               |      |
| PC  | SPM     | 4 | 13.3  | 5.20                | N.S  |
|     | control | 4 | 31.2  | 29.76               |      |
| SM  | SPM     | 4 | 3.6   | 3.95                | N.S  |
|     | control | 4 | 4.1   | 4.23                |      |

N.S = No significativo.



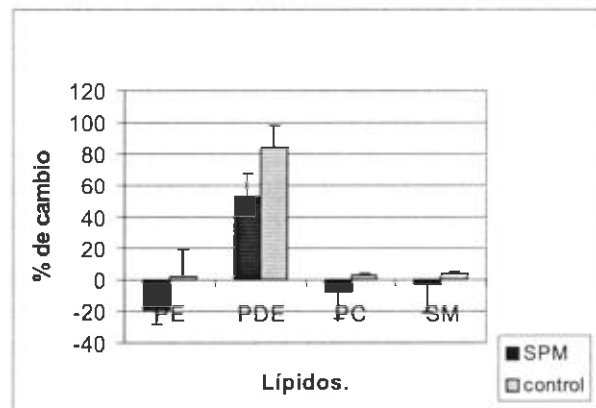
**Figura 5. Valores Promedios de formación de PE, PDE, PC y SM en mujeres con SPM y mujeres control. Fase Folicular. Membranas Invertidas**

(\*) La concentración de los lípidos fue determinada mediante la técnica de centelleo líquido tal como se describe en materiales y métodos. Se representan en la figura los % promedios ± SD, de muestras corridas por duplicado.

**Tabla 2. Formación de PE, PDE, PC y SM en la Fase Luteal del ciclo menstrual usando membranas Invertidas.(\*)**

|     | CASOS   | N | Media | Desviación Estándar | Sig.   |
|-----|---------|---|-------|---------------------|--------|
| PE  | SPM     | 4 | -18.8 | 9.63                | N.S    |
|     | control | 4 | 1.9   | 16.77               |        |
| PDE | SPM     | 4 | 53.0  | 15.04               | P<0.05 |
|     | control | 4 | 83.9  | 14.20               |        |
| PC  | SPM     | 4 | -7.7  | 17.11               | N.S    |
|     | control | 4 | 2.9   | 0.92                |        |
| SM  | SPM     | 4 | -3.4  | 17.99               | N.S    |
|     | control | 4 | 3.4   | 1.32                |        |

N.S. = No significativo.



**Figura 6. Valores promedios de formación de PE, PDE, PC y SM, en mujeres con SPM y mujeres Control. Fase Luteal. Membranas Invertidas**

(\*) La concentración de los lípidos fue determinada mediante la técnica de centelleo líquido tal como se describe en materiales y métodos. Se representan en la figura los % promedios ± SD, de muestras corridas por duplicado.

**Tabla 3: Formación de PE, PDE, PC y SM en la Fase Folícula del ciclo menstrual usando membranas No Invertidas.(\*)**

|     | CASOS   | N | Media | Desviación Estándar | Sig. |
|-----|---------|---|-------|---------------------|------|
| PE  | SPM     | 4 | 18.2  | 10.80               | N.S  |
|     | control | 4 | 25.0  | 12.30               |      |
| PDE | SPM     | 4 | 29.3  | 32.73               | N.S  |
|     | control | 4 | 62.8  | 11.44               |      |
| PC  | SPM     | 4 | 16.7  | 30.73               | N.S  |
|     | control | 4 | 7.7   | 7.95                |      |
| SM  | SPM     | 4 | 6.9   | 13.22               | N.S  |
|     | control | 4 | -1.4  | 5.75                |      |

N.S.= No significativo.

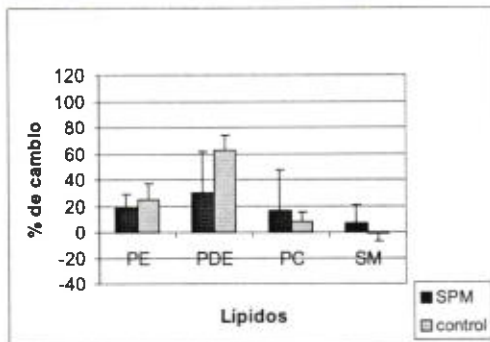


Figura 7. Valores promedios de formación de PE, PDE, PC y SM, en mujeres con SPM y mujeres Control. Fase Folicular Membranas No Invertidas

(\*) La concentración de los lípidos fue determinada mediante la técnica de centelleo líquido tal como se describe en materiales y métodos. Se representan en la figura los % promedios ± SD, de muestras corridas por duplicado

Tabla 4: Formación de PE, PDE, PC y SM en la Fase Luteal del ciclo menstrual usando membranas No Invertidas. (\*)

|     | CASOS   | N | Media | Desviación Estándar | Sig.   |
|-----|---------|---|-------|---------------------|--------|
| PE  | SPM     | 4 | 8.7   | 37.42               | N.S    |
|     | control | 4 | 10.7  | 7.09                |        |
| PDE | SPM     | 4 | 37.8  | 9.75                | N.S    |
|     | control | 4 | 33.5  | 18.04               |        |
| PC  | SPM     | 4 | -3.4  | 21.63               | P<0.05 |
|     | control | 4 | 33.4  | 22.89               |        |
| SM  | SPM     | 4 | 4.7   | 4.29                | P<0.05 |
|     | control | 4 | 21.6  | 12.12               |        |

N.S = No significativo

Tabla 5. Comparación de la formación de PE, PDE, PC y SM entre la Fase Folicular y Luteal, usando membranas Invertidas. (\*)

| Síndrome Premenstrual |                         |   |       |                     |        |
|-----------------------|-------------------------|---|-------|---------------------|--------|
|                       |                         | N | Media | Desviación Estándar | Sig.   |
| PE                    | (folicular) vs (luteal) | 4 | 18.2  | 10.80               | N.S    |
|                       |                         | 4 | 8.7   | 37.42               |        |
| PDE                   | (folicular) vs (luteal) | 4 | 29.2  | 32.73               | N.S    |
|                       |                         | 4 | 37.8  | 9.75                |        |
| PC                    | (folicular) vs (luteal) | 4 | 16.7  | 30.73               | N.S    |
|                       |                         | 4 | -3.4  | 21.63               |        |
| SM                    | (folicular) vs (luteal) | 4 | 6.8   | 13.22               | N.S    |
|                       |                         | 4 | 4.7   | 4.29                |        |
| Control               |                         |   |       |                     |        |
|                       |                         | N | Media | Desviación Estándar | Sig.   |
| PE                    | (folicular) vs (luteal) | 4 | 25.0  | 12.30               | N.S    |
|                       |                         | 4 | 10.7  | 7.09                |        |
| PDE                   | (folicular) vs (luteal) | 4 | 62.8  | 11.44               | P<0.05 |
|                       |                         | 4 | 33.5  | 18.04               |        |
| PC                    | (folicular) vs (luteal) | 4 | 7.7   | 7.95                | N.S    |
|                       |                         | 4 | 33.4  | 22.89               |        |
| SM                    | (folicular) vs (luteal) | 4 | -1.3  | 5.75                | N.S    |
|                       |                         | 4 | 21.6  | 12.12               |        |

(\*) La concentración de los lípidos fue determinada mediante la técnica de centelleo líquido tal como se describe en materiales y métodos.

Se representan en la figura los % promedios ± SD, de muestras corridas por duplicado.

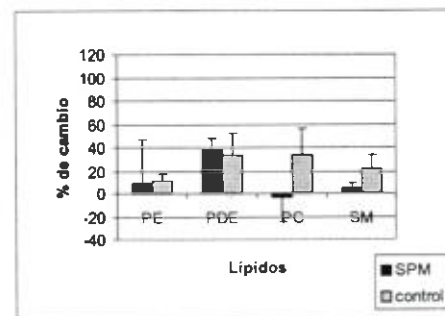


Figura 8: Valores promedios de formación de PE, PDE, PC y SM, en mujeres con SPM y mujeres Control. Fase Luteal. Membranas No Invertidas

(\*) La concentración de los lípidos fue determinada mediante la técnica de centelleo líquido tal como se describe en materiales y métodos.

La tabla muestra los valores de % promedios ± SD, de muestras corridas por duplicado.

Tabla 6: Comparación de la formación de PE, PDE, PC y SM entre la Fase Folicular y Luteal, usando membranas No Invertidas (\*)

| Síndrome Premenstrual |                         |   |       |                     |        |
|-----------------------|-------------------------|---|-------|---------------------|--------|
|                       |                         | N | Media | Desviación Estándar | Sig.   |
| PE                    | (folicular) vs (luteal) | 4 | -2.7  | 25.37               | N.S    |
|                       |                         | 4 | -18.8 | 9.63                |        |
| PDE                   | (folicular) vs (luteal) | 4 | 67.9  | 23.45               | N.S    |
|                       |                         | 4 | 53.0  | 15.04               |        |
| PC                    | (folicular) vs (luteal) | 4 | 13.3  | 5.19                | P<0.05 |
|                       |                         | 4 | -7.7  | 17.11               |        |
| SM                    | (folicular) vs (luteal) | 4 | 3.6   | 3.95                | N.S    |
|                       |                         | 4 | -3.4  | 17.99               |        |
| Control               |                         |   |       |                     |        |
|                       |                         | N | Media | Desviación Estándar | Sig.   |
| PE                    | (folicular) vs (luteal) | 4 | -3.8  | 8.20                | N.S    |
|                       |                         | 4 | 1.9   | 16.77               |        |
| PDE                   | (folicular) vs (luteal) | 4 | 77.8  | 12.43               | N.S    |
|                       |                         | 4 | 83.9  | 14.20               |        |
| PC                    | (folicular) vs (luteal) | 4 | 31.2  | 29.76               | N.S    |
|                       |                         | 4 | 2.9   | 0.92                |        |
| SM                    | (folicular) vs (luteal) | 4 | 4.1   | 4.23                | N.S    |
|                       |                         | 4 | 3.4   | 1.32                |        |

(\*) La concentración de los lípidos fue determinada mediante la técnica de centelleo líquido tal como se describe en materiales y métodos.

La tabla muestra los valores de % promedios ± SD, de muestras corridas por duplicado.

### CONCLUSIONES

La Transmetilación a nivel de membrana plasmática en eritrocito estaría afectada en las mujeres con Síndrome Premenstrual disminuyendo la formación de Fosfatidilcolina (PC) que es producto final de esta transmetilación y esta diferencia es observada en la Fase Folicular del Ciclo menstrual cosa que no ocurre con el grupo Control.



LITERATURA CITADA

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION.** 1987. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disor. Revised. 3th. Edition (DSM -III -R). Washington DC. APA.
- BACKSTOM T. M.** 1983. Sexuality, hormones and the menstrual cycle.II. Hormone levels and their relationship to the premenstrual syndrome. *Psychosom. Med.* 45: 503-507.
- BALDESSARINI R.** 1987. Neuropharmacology of [SAME]. *Am.J.Med.* 83 (suppl 5A) 95-103.
- BARCELÓ-COBLIJN G.** 2003. Dynamic of long-polyunsaturated fatty acids in rat brain. *Acta Biologica Szegediensis.* 47(1-4): 55.
- BOTTIGLIERI T,** Hyland K. 1974. Sadenosylmethionine. Levels in psychiatric and neurological disorder: A review *Acta Neurol Scand.* 154:19-26.
- BOTTIGLIERI T.** 2000. Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. *J Neuro Neurosurg Psychiatry.* 69: 228-232.
- BOTTIGLIERI T.** 2002. S-adenosyl-L-methionine (SAME): from the bench to the bedside- molecular basis of a pleiotrophic molecule. *Am J Clin Nutr.* 76 (suppl):1151S-7S.
- BRADFORD M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248-254.
- BRESSA G.** 1994. S-adenosyl-L-methionine (SAME) as antidepressant: Meta -analysis of clinical studies. *Acta Neurol.* 154: 7-14.
- CARNEY, MW.** 1987. S-adenosylmethionine and affective disorder. *Ann. J. Med.* 83:104-106.
- CONNOR J, Gillum K, Schroit AJ.** 1990. Maintenance of lipid asymmetry in red blood cells and ghost: effect of divalent cations and serum albumin on the transbilayer distribution of phosphatidylserine. *Biochim Biophys Acta.* 1025(1): 82-86.
- CUI Z,** Houweling M. 2002. Phosphatidylcholine and cell death. *Biochim Biophys Acta.* 1585(2-3):87-96.
- CUI Z,** Vance J, Vance D.E. 1993. Cloning and expression of a novel phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. *J. Biol Chem.* 268(22):16655-16663.
- DE JONG R,** Rubinow D. 1985. Premenstrual mood disorder and psychiatric illness. *Am. J. Psychiatry.* 142(11): 1359-1361.
- DE LONG C,** You-Jun Shen. 1999. Molecular distinction of phosphatidylcholine synthesis between the CDP-Choline pathway and phosphatidylethanolamine methylation pathway. *J. Biological Chemistry.* 274(42): 29683-29688.
- DONNA A.** 1986. Medication effects on one- carbon metabolism in schizophrenia, mania, and major depression. *Journal of Clinical Psychopharmacology.* 6(3): 155-160.
- DROUVA S,** Laplante E. 1986. Estradiol activates methylating enzyme(s) involved in the conversion of phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine in rat pituitary membranes. *Endocrinology.* 119(6): 2611-2621.
- DUGAN JM,** Dise CA, Goodman DB. 1985. Preparation of inside out vesicles from erythrocyte membranes inactivates the pathway for oleic acid incorporation into phospholipid. *Biochem Biophys. Acta.* Jun 11: 816.
- FACCHINETTI F,** Genazzari A. 1993. Neuroendocrine changes in luteal function in patients with premenstrual syndrome. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 76(5):1123-1127.
- FREEMAN EW.** 2003. Premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder: definition and diagnosis. *Psychoneuroendocrinology.* 28 Suppl 3:25-37.
- GALLO C,** Poletti G, Mazzotti G, Rodriguez J, Mamprin M, and Cazorla A. 1993. Erythrocyte phospholipid composition and lithium ratio in premenstrual syndrome. XXXII International Congress of Physiological Science, Glasgow, UK. Poster.
- GALLO C.** 1995. Relación de la tasa de litio con los cambios hormonales del ciclo menstrual y la composición lipídica de la membrana del eritrocito. *Diagnóstico.* 34(2): 22-28.
- GARCIA-TREVIJANO E.R.** 2000. S-adenosylmethionine regulates MAT1A and MAT2A gene expression in cultured rat hepatocyte: a new role for S-adenosylmethionine in the maintenance status of the liver. *FASEB.J.* 15: 2511-2518.
- GIBSON K,** Wilson J. 1961. The enzymatic conversion of phospholipid ethanolamine to phospholipid choline in rat liver. *J.Biol.Chem.* 236: 673-679.
- GULIO L,** Cantoni S. 1989. Affective disorder and S-adenosylmethionine: A New Hypothesis. *TINS.* 12(9): 319-324
- HABORI M.** 1995. Microcompartmentation, metabolic channeling and carbohydrate metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 27(2): 132-132.
- HALBREICH U.** 2003. The etiology, biology, and evolving pathology of premenstrual syndromes. *Psychoneuroendocrinology.* Suppl. 3:55-99.
- HIRATA F** and Axelrod J. 1978b. Enzymatic synthesis and rapid translocation of phosphatidylcholine by two methyltransferases in erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 2348-2352.
- HIRATA F** and Axelrod J. 1979. B -Adrenergic receptor agonists increase phospholipid methylation, membrane fluidity, and B-adrenergic receptor-adenylate cyclase coupling . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76(1): 368-372.
- HIRATA F,** and Axelrod J. 1978a. Identification and properties of two methyltransferases in conversion of phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* 75: 1718-1721.
- HIRATA F,** and Axelrod J. 1980. Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Science.* 209: 1082-1090.

- KAKIMOTO H. 1992.** Change in lipid composition of erythrocyte membranes with administration of S-adenosylmethionine in chronic liver disease. *Gastroenterol. Jpn.* 4: 508-513.
- KOHWEIN S. 1992.** Concepts in biochemistry biological membranes function and assembly. *J. of Chem. Educ.* 69(1): 3-9.
- LEW V, Hockaday A. 1988.** Mechanism of spontaneous inside-out vesiculation of red cell membranes. *J Cell Biology.* 106:1893-1901.
- LIEBER CS. 2004.** New concepts of the pathogenesis of alcoholic liver disease lead novel treatments. *Cur Gastroenterol Rep.* 6(1): 60-65.
- LOWRY O.H. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265
- LUBERTO C, Hannun YA. 1998.** Sphingomyelin synthase, a potential regulator of intracellular levels of ceramide and diacylglycerol during SV 40 transformation. Does sphingomyelin synthase account for the putative phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *J. Biol Chem.* 273 (23):14550-14559.
- MAHER T. 2000.** SAME: S-adenosylmethionine. Continuing Education Module. New Hope Institute of Retailing.
- MARGGRAF WD, Anderer FA. 1981.** The formation of sphingomyelin from phosphatidylcholine in plasma membrane preparations from mouse fibroblast. *Biochem Biophys Acta.* 664(1):61-73.
- MATCHERI S, Kashavan A. 1993.** Erythrocyte membrane phospholipids in psychotic patients. *Psychiatr Research.* 49: 89-95.
- MATHEWS C, Holde K, Ahern K. 1974.** *Bioquímica. Tercera Edición.* Editorial Adisson Wesley. Capítulos: 10, 11, 19.
- METHODS IN ENZYMOLOGY. 1974.** Preparation of impermeable ghost and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes Vol. XXXI. *Biomembranes Part. A* pag.172-175. Editado por Sidney Colowick y Nathan Kaplan.
- METHODS IN ENZYMOLOGY. 1974.** The preparation of red cell ghost. Vol. XXXI. *Biomembranes Part. A* pag. 168-175. Editado por Sidney Colowick y Nathan Kaplan.
- MORRIS K. 1986.** Techniques of lipidology, Isolation, Analysis and Identification of lipids. 2nd revised edition. ELSEVIER.
- MORRISON L. 1996.** Brain [SAME] levels are severely decreased in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 67: 1328-31.
- MORTOLA J. 1998.** Premenstrual syndrome-pathophysiologic considerations. *NEJM.* 338(4): 256-257.
- NELSON D, Cox M. 2000.** *Lehninger Principles of Biochemistry.* Third Edition. Worth Publishers.
- PERCY AK, Schemell E. 1988.** Biosynthesis in the membranes of immature and mature red blood cells. *Cel. Biochemystry.* 171: 213-216.
- REID R. 1987.** Premenstrual Syndrome. *AACC ENDO.* 5(12):1-12.
- REITZ RC. 1993.** Phospholipid methylation in brain membrane preparation: kinetic mechanism. *Biochem. Biophys. Acta.* 1993. 1166(2-3): 139-144.
- ROBERTS M. 1994.** First thoughts on lipid second messengers. *Trends in Cell Biology.* 4:219-223.
- ROSE HG, and Oklander MJ. 1965.** Improved procedure for extraction of lipid from human erythrocyte. *J.Lipid Res.* 65:428-431
- RYZANTERA NV. 2002** Change in the lipid phase of erythrocyte membranes in patients with paranoid schizophrenia. *Bull. Exp. Biol. Med.* Jan. 133. (11): 84-86.
- SCHMIT J, Nieman L. 1998.** Differential behavioral effect of gonadal estrogens in women with and those without premenstrual syndrome. *NEJM.* 338(4): 209-216.
- SINGER, S.J. 1992.** The structure and function of membranes: A personal Memoir. *Membrane Biol.* 129: 3-12.
- STEINER M, Macdougall M, Brown E. 2003.** The premenstrual symptoms screening tool (PSSST) for clinicians. *Arch Women Ment Health.* 6(3):203-209.
- STREMENTINOLI G. 1987.** Pharmacologic aspect of [SAME]. *Am. J. Med.* 83: 35-42.
- STRITTMATTER W, Hirat F, Axelord J. 1979.** Benzodiazepine and B- adrenergic receptor ligands independently stimulate phospholipid methylation. *Nature.* 282:857- 859.
- STRYER L. 1990.** *Bioquímica. Tercera edición Tomo 2. Capítulo 23. Editorial Reverté.*
- TACCONI M, Wurtman RJ. 1985.** Rat brain phosphatidyl-N,N-dimethylethanolamine is rich in polyunsaturated fatty acids. *J Neurochem.* 45(3):805-809.
- TAVONI A. 1987.** Evaluation of [SAME] in primary fibromyalgia. *Am, J. Med.* 3:107-110.
- STRITTMATTER W, Hirat F, Axelord J. 1979,** Benzodiazepine and B- adrenergic receptor ligands independently stimulate phospholipid methylation. *Nature.* 282:857- 859.
- STREMENTINOLI G. 1987.** Pharmacologic aspect of [SAME]. *Am. J. Med.* 83: 35-42.
- STRYER L. 1990.** *Bioquímica. Tercera edición Tomo 2. Capítulo 23. Editorial Reverté.*
- TACCONI M, Wurtman RJ. 1985.** Rat brain phosphatidyl-N,N-dimethylethanolamine is rich in polyunsaturated fatty acids. *J Neurochem.* 45:805-809.
- TAVONI A. 1987.** Evaluation of [SAME] in primary fibromyalgia. *Am, J. Med.* 1987; 3:107-110.