

Bionatura

Genome reprogramming in cells that escape from senescence

Clinical Dengue Virus Isolates

Microscopía Electrónica de Transmisión

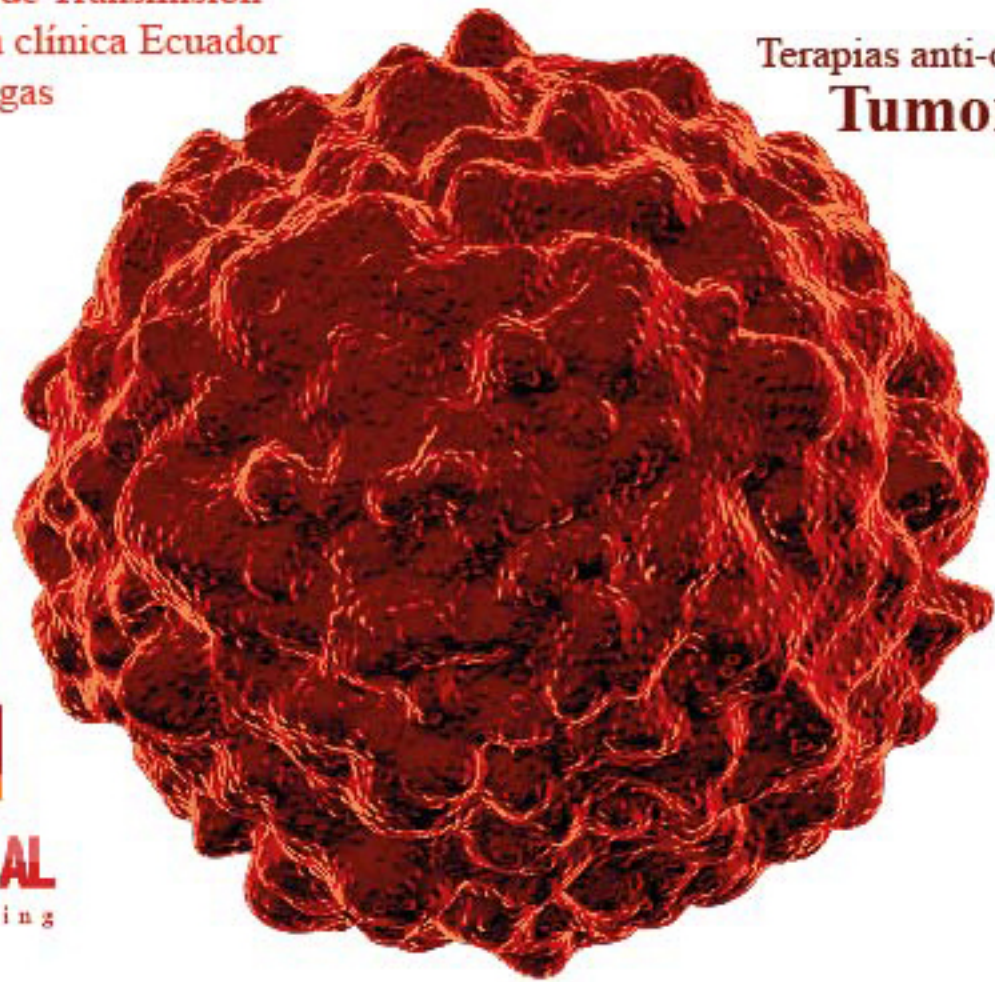
Avances en investigación clínica Ecuador

Cianobacterias y microalgas

Ebola

Terapias anti-cáncer

Tumor



latindex

INTERNATIONAL
Scientific Indexing

OPEN ACCESS



clinicalbiotec.com



UUCO
Universidad Católica de Oriente



Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente



La Revista Bionatura publica trimestral en español o inglés trabajos inéditos de investigaciones básicas y aplicadas en el campo de la Biotecnología, la Inmunología, la Bioquímica, Ensayos Clínicos y otras disciplinas afines a las ciencias biológicas, dirigidas a la obtención de nuevos conocimientos, evaluación y desarrollo de nuevas tecnologías, productos y procedimientos de trabajo con un impacto a nivel mundial.

Equipo editorial

Editor General / Editorial Manager

Dr. Nelson Santiago Vispo. PhD. Profesor / Investigador. Universidad Yachay Tech, Ecuador.

Consejo Editorial / Editorial Board

- Dra. Daynet Sosa del Castillo. PhD. Directora del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador. CIBE-ESPOL
- Dr. Dagoberto Castro Restrepo. PhD, Profesor / Investigador. Director Investigación y Desarrollo. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia
- Dra. Thelvia I. Ramos Gómez. MD, Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Ecuador.
- Dr. Oliberto Sánchez. Profesor Asociado. Universidad de Concepción, Chile.
- Dr. Jorge Roberto Toledo. Profesor Asociado. Universidad de Concepción, Chile.
- Dr. Aminael Sánchez Rodríguez. PhD. Director del departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Técnica Particular de Loja
- Dr. Manuel Limonta. Prof. PhD. Director: Regional Office for Latin American and the Caribbean International Council for Science (ICSU). Doctor honoris causa Autonomous Metropolitan University of Mexico City (UAM). Dr. Honoris Causa - Universidad Central Ecuador.
- Dra. Consuelo Macías Abraham. Especialista de II Grado en Inmunología, Investigadora y Profesora Titular, Doctora en Ciencias Médicas y Miembro Titular de la Academia de Ciencias de Cuba. Directora del Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), de La Habana, Cuba.
- Dr. Eduardo López Collazo. Director IdiPAZ Institute of Biomedical Research, La Paz Hospital, España.
- Dra. Hortensia María Rodríguez Cabrera. Profesora Investigadora. Universidad de Yachay Tech, Ecuador.
- Dra. Vivian Morera. Directora de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Universidad de las Américas, Ecuador.
- Dr. Eduardo Penton. MD, PhD, Investigador Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba
- Dr. Luis Trujillo. Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Ecuador.
- Dra. Celia Fernandez Ortega. Investigadora Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba.
- Dra. Lisset Hermida. Investigadora Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba
- Dr. Gerardo Ferbeyre. Full Professor. Département de biochimie. Faculté de Médecine. Université de Montréal, Canadá.
- Dra. Marbel Torres Arias. Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Ecuador.
- Dr. Rachid Seqqat. Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Ecuador.
- Dra. Ligia Isabel Ayala Navarrete. Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Ecuador.
- Dr. Tirso Pons. Staff Scientist. Structural Biology and Biocomputing Programme (CNIO), España.
- Dr. Ramón Guimil. Senior Director. Oligonucleotide Chemistry bei Synthetic Genomics, Estados Unidos.
- Dra. Maritza Pupo. Profesora investigadora. Facultad de Biología. Universidad de la Habana, Cuba.

Editor Jefe / Chief Editor

Dr. Julio Pineda Insuasti. PhD. Director / Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA). , Ecuador,

- Dr. Fidel Ovidio Castro. Founder, Profesor investigador. Tecelvet, Chile.
- Dr. Che Serguera. French Institute of Health and Medical Research. MIRcen, CEA, Fontenay-aux-Roses Paris, France
- Dra. Olga Moreno. Partner, Head Patent Division. Jarry IP SpA, Chile.
- Dra. Luciana Dente. Profesora Investigadora. Universidad de Pisa, Italia.
- Dr. Carlos Borroto. Asesor de Transferencia de Tecnología. Dirección General at Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY), México.
- Dr. Javier Menéndez. Manager Specialist Process and Product 5cP. Sanofi Pasteur, Canadá.
- Dr. Fran Camacho. PHD Researcher. Universidad de Concepción, Chile
- Dr. Pedro Valiente. Profesor investigador. Facultad de Biología. Universidad de la Habana, Cuba.
- Dr. Diógenes Infante. Prometeo / SENESCYT. Especialista de primer nivel en Biotecnología. Universidad de Yachay Tech, Ecuador.
- Dra. María Elena Fleitas Mesa. Profesora Investigadora. Universidad Técnica del Norte, Ecuador.
- Dra. Georgina Michelena. Profesora Investigadora. Organización de las Naciones Unidas. (ONU), Suiza.
- Dr. Francisco Barona, Profesor Asociado. Langebio Institute, México
- Dr. Gustavo de la Riva. Profesor Investigador Titular. Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, México.
- Dr. Manuel Mansur. New Product Introduction Scientist (NPI) at Elanco Animal Health Ireland, Irlanda.
- Dr. Rolando Pajón. Associate Scientist, Meningococcal Pathogenesis and Vaccine Researc. Center for Immunobiology and Vaccine Development, UCSF Benioff Children's Hospital Oakland", Estados Unidos.
- Dr. José Manuel Pais Chanfrau. Universidad Técnica del Norte, Ecuador.
- Dr. Reynerio Álvarez. Prometeo / SENESCYT. Especialista de primer nivel en Biotecnología. Universidad Central del Ecuador, Ecuador
- Dra. Ileana Rosado Ruiz-Apodaca. Profesor / Investigador. Universidad de Guayaquil, Ecuador.
- Dr. Carlos Eduardo Giraldo Sánchez. PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia
- Dra. Nubia Yineth Velásquez Velásquez. PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia
- Dr. Mario Alberto Quijano Abril. PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia
- Dr. Samir Julián Calvo Cardona. PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia
- Dr. Felipe Rojas Rodas. PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia
- Dra. Isabel Cristina Zapata Vahos, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia

Redacción y Edición / Copyediting and corrections

MSc. José Enrique Alfonso Manzanet.
Mg. Frey A. Narváez-Villa.
Victor M. Santiago Padilla

Diseño y Realización gráfica / Graphic design and production

DI. José Manuel Oubiña González.

Instrucciones para los Autores

Los Trabajos serán Inéditos: Una vez aprobados, no podrán someterse a la consideración de otra revista, con vistas a una publicación múltiple, sin la debida autorización del Comité Editorial de la Revista. La extensión máxima será 8 cuartillas para los trabajos originales, 12 las revisiones y 4 las comunicaciones breves e informes de casos, incluidas las tablas y figuras. Los artículos se presentarán impresos (dos ejemplares). Todas las páginas se numerarán con arábigos y consecutivamente a partir de la primera. Estos deben acompañarse de una versión digital (correo electrónico o CD) en lenguaje Microsoft Word, sin sangrías, tabuladores o cualquier otro atributo de diseño (títulos centrados, justificaciones, espacios entre párrafos, etc.). Siempre se ha de adjuntar la carta del consejo científico que avala la publicación y una declaración jurada de los autores. Referencias Bibliográficas. Se numerarán según el orden de mención en el texto y deberán identificarse mediante arábigos en forma exponencial. Los trabajos originales no sobrepasarán las 20 citas; las revisiones, de 25 a 50 y las comunicaciones breves e informes de casos. En las Referencias en caso de que las publicaciones revisadas esten online se debe proveer un enlace consistente para su localización en Internet. Actualmente, no todos los documentos tienen DOI, pero si lo tienen se debe incluir como parte de la referencias. Si no tuviese DOI, incluir la URL.

Tablas, modelos y anexos: Se presentarán en hojas aparte (no se intercalarán en el artículo) y en forma vertical numeradas consecutivamente y mencionadas en el texto. Las tablas se ajustarán al formato de la publicación se podrán modificar si presentan dificultades técnicas.

Figuras: Las fotografías, gráficos, dibujos, esquemas, mapas, salidas de computadora, otras representaciones gráficas y fórmulas no lineales, se denominarán figuras y tendrán numeración arábica consecutiva. Se presentarán impresas en el artículo en páginas independientes y en formato digital con una resolución de 300 dpi. Todas se mencionarán en el texto. Los pies de figuras se colocarán en página aparte. El total de las figuras y tablas ascenderá a 5 para los trabajos originales y de revisión y 3 para las comunicaciones breves e informes de casos.

Abreviaturas y siglas: Las precederá su nombre completo la primera vez que aparezcan en el texto. No figurarán en títulos ni resúmenes. Se emplearán las de uso internacional.

Sistema Internacional de Unidades (SI): Todos los resultados de laboratorio clínico se informarán en unidades del SI o permitidas por este. Si se desea añadir las unidades tradicionales, se escribirán entre paréntesis. Ejemplo: glicemia: 5,55 mmol/L (100 mg/100 mL).

Para facilitar la elaboración de los originales, se orienta a los autores consultar los requisitos uniformes antes señalados disponibles en: [http://www.fisterra.com/recursos_web/mbelvancouver.htm#ilustraciones%20 \(figura\)](http://www.fisterra.com/recursos_web/mbelvancouver.htm#ilustraciones%20(figura))

Los trabajos que no se ajusten a estas instrucciones, se devolverán a los autores. Los aceptados se procesarán según las normas establecidas por el Comité Editorial. El arbitraje se realizará por pares y a doble ciego en un período no mayor de 60 días. Los autores podrán disponer de no más de 45 días para enviar el artículo con correcciones, se aceptan hasta tres reenvíos. El Consejo de Redacción se reserva el derecho de introducir modificaciones de estilo y /o acotar los textos que lo precisen, comprometiéndose a respetar el contenido original. El Comité Editorial de la Revista se reserva todos los derechos sobre los trabajos originales publicados en esta.

- La **Revista Bionatura** es un medio especializado, interinstitucional e interdisciplinario, para la divulgación de desarrollos científicos y técnicos, innovaciones tecnológicas, y en general, los diversos tópicos relativos a los sectores involucrados en la biotecnología, tanto en Ecuador como en el exterior; así mismo, la revista se constituye en un mecanismo eficaz de comunicación entre los diferentes profesionales de la biotecnología.
- Es una publicación sin ánimo de lucro. Los ingresos obtenidos por publicidad o servicios prestados serán destinados para su funcionamiento y desarrollo de su calidad de edición. (<http://revistabionatura.com/media-kit.html>)
- Es una revista trimestral, especializada en temas concernientes al desarrollo teórico, aplicado y de mercado en la biotecnología.
- Publica artículos originales de investigación y otros tipos de artículos científicos a consideración de su consejo editorial, previo proceso de evaluación por pares (peer review) sin tener en cuenta el país de origen.
- Los idiomas de publicación son el Español e Inglés.
- Los autores mantienen sus derechos sobre los artículos sin restricciones y opera bajo la política de Acceso Abierto a la Información, bajo la licencia de Creative Commons 4.0 CC BY-NC-SA (Reconocimiento-No Comercial-Compartir igual).

Esta revista utiliza **Open Journal Systems**, que es un gestor de revistas de acceso abierto y un software desarrollado, financiado y distribuido de forma gratuita por el proyecto Public Knowledge Project sujeto a la Licencia General Pública de GNU.

Nuestros contactos deben ser dirigidos a:

Revista Bionatura: editor@revistabionatura.com

ISSN: 1390-9347 (Versión impresa)

Formato: 21 x 29,7 cm

ISSN: 1390-9355 (Versión electrónica)

Sitio web: <http://www.revistabionatura.com>

Publicación periódica trimestral

Esta revista utiliza el sistema peer review para la evaluación de los manuscritos enviados.

Instrucciones a los autores en:

<http://revistabionatura.com/instrucciones.html>

Asistente de publicación / Publication assistant

Evelyn Padilla Rodriguez (sales@revistabionatura.com)

EDITORIAL

Terapias anticáncer

Cancer therapies

Nelson Santiago Vispo

51

CARTA AL EDITOR / LETTER TO THE EDITOR

Avances en investigación clínica en Ecuador

Advances in clinical research in Ecuador

Karina Alexandra Castro, Luis Santiago Escalante

53

INVESTIGACIÓN / RESEARCH

Genome reprogramming in cells that escape from senescence

Reprogramación del genoma en células que escapan de la senescencia

Xavier Deschênes-Simard, Stéphane Roy, Gerardo Ferbeyre

54

Association of gliadin antibodies, HLA alleles, and schizophrenia in Cuban population patients

Asociación de anticuerpos antigliadina, alelos HLA y esquizofrenia en pacientes cubanos

José A. Galván, Hanlet Camacho, William W. Eaton, Marcelo Nazabal, María E. Fernández de Cossio, Isabel Guillen, Seidy Pedroso, Raúl Mendoza, Annia Ferrer, Juan Roca, Jesús Benitez, Lidia Inés Novoa.

62

Comparison of two methods with potential application in the detection of viremia produced by clinical dengue virus isolates

Comparación de dos métodos con aplicación potencial en la detección de viremia a partir de aislamientos clínicos de virus dengue

Jorge Martín, Laura Lazo, Iris Valdés, Lázaro Gil, Yaremis Romero, Jorge Castro, Gerardo Guillén, Lisset Hermida

67

Administración del HeberFERON en el carcinoma basocelular palpebral a propósito de 2 casos

Administration HeberFERON in the eyelid basal cell carcinoma about 2 cases

Irene Rojas Rondón, Yaquelin Duncan Roberts, Clara G. Gómez Cabrera, Lázara K. Ramírez García, Lázaro Vigoa Aranguen, Reinier Hernández Rodríguez, Angela Tuero Iglesias, Iraldo Bello Rivero

71

COMUNICACIÓN CORTA / SHORT COMMUNICATION

Characterization nanoparticles-based vaccines and vaccine candidates: a Transmission Electron Microscopy study

Caracterización por Microscopía Electrónica de Transmisión de vacunas y candidatos vacunales basados en nanopartículas

I. Menéndez I, L. Hermida, A. Hernández, J.C. Aguilar, R. Garateix, R. Molina, D. Pérez, M Pilar. Rodríguez, J. León, V. Falcón.

75

REVISIÓN / REVIEW

Compuestos bioactivos aislados de cianobacterias y microalgas: propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina

Active compounds from cyanobacteria and microalgae: properties and potential applications in biomedicine

Alexey Llopiz

79

Mecanismos de invasión del esporozoíto y merozoíto de plasmodium

Mechanisms of invasion from sporozoite and merozoíto of plasmodium

Lilian M. Spencer, Andreina Gómez, Eva Collovini

89

NOTICIAS Y OPINIONES / NEWS AND VIEWS

“Voci su Ebola” Project : a brick of the “Science Memories” Archive

Proyecto “Voci Do Ébola”: una parte del archivo “Science Memories”

Paola Vaccaro

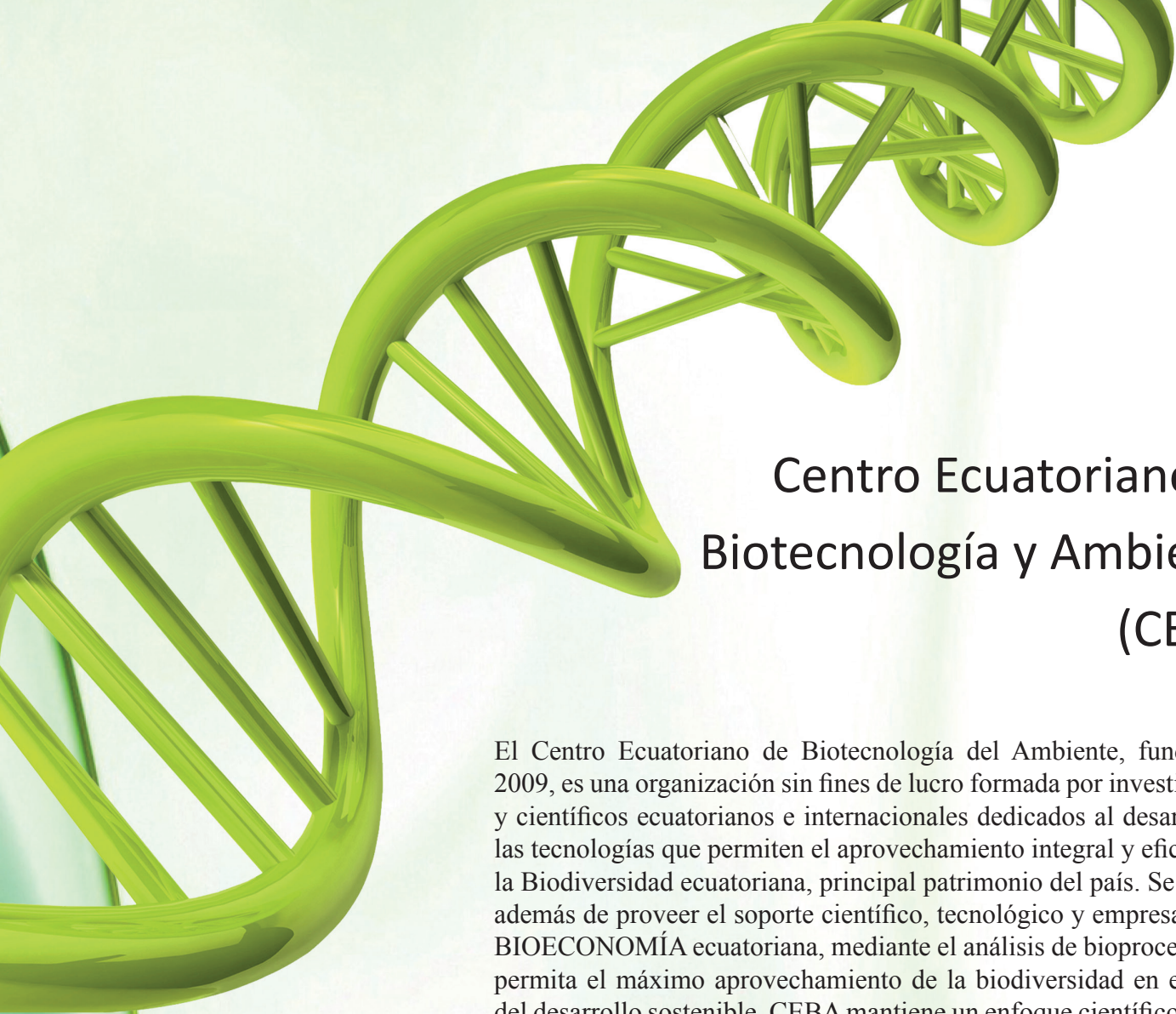
95

Apertura de la Carrera de Medicina en la UTN. Un sueño hecho realidad en el norte de Ecuador

Opening of the Career of Medicine at the UTN. A dream come true for northern Ecuador

Salomé Gordillo Alarcón

97



Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA)

El Centro Ecuatoriano de Biotecnología del Ambiente, fundado en 2009, es una organización sin fines de lucro formada por investigadores y científicos ecuatorianos e internacionales dedicados al desarrollo de las tecnologías que permiten el aprovechamiento integral y eficiente de la Biodiversidad ecuatoriana, principal patrimonio del país. Se encarga además de proveer el soporte científico, tecnológico y empresarial a la BIOECONOMÍA ecuatoriana, mediante el análisis de bioprocesos, que permita el máximo aprovechamiento de la biodiversidad en el marco del desarrollo sostenible. CEBA mantiene un enfoque científico-empresarial, con una filosofía de trabajo por resultados fundamentada en la competitividad.

CEBA promueve y apoya toda labor encaminada a la preservación del medio ambiente y los diferentes ecosistemas participando en proyectos que buscan estudiar, monitorear o proteger el medio ambiente del mal uso o la degradación que implica el accionar humano. Las actividades de CEBA pueden ir desde realizar campañas informativas utilizando la plataforma de la Revista Bionatura y conferencias y apoyar la consecución de proyectos económicos sustentables.

Julio Pineda Insuasti, PhD

Director Ejecutivo

Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente
Calle Bolívar 13-118 (Of.11) y Av. Teodoro Gómez De la Torre

Cel: (+593) 99 5797813, julio.pineda@ceba.one

www.ceba.one,

Ibarra-Ecuador



Calle Bolívar 13 -118 y Ave. Teodoro Gómez,
cebaecuador@gmail.com
Cel. +593995797813

EDITORIAL

Terapias anticáncer

Cancer therapies

Nelson Santiago Vispo

DOI. 10.21931/RB/2016.01.02.1

El cáncer es el nombre que reciben un grupo de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento descontrolado de tipos de células en específico, las cuales pueden progresar, expandirse e invadir distintos órganos, proceso conocido como metástasis. Estas células malignas pueden producir diferentes efectos negativos en el organismo entre los que se encuentra la muerte, siendo una de las primeras causas de morbi-mortalidad en todo el mundo, con aproximadamente 14 millones de casos en el 2012. Este número se espera que aumente en un 70 % en las próximas 2 décadas.¹

En Ecuador según GLOBOCAN 2012, un proyecto de la Organización Mundial de la Salud, se estimó que, en ese año, la incidencia de cáncer en hombres fue de 162 por 100.000 habitantes, por encima de países como Perú (140,9) o Venezuela (146,9), pero por debajo de Brasil (231,6) o Cuba (250,8).² En el 2013, se estima que se presentaron 134,9 casos de cáncer en mujeres y 125,9 casos en hombres por cada 100.000 habitantes, según proyecciones del Registro Nacional de Tumores del Ecuador.³

Más del treinta por ciento de las muertes por cáncer pueden prevenirse modificando los factores de riesgo conductuales y dietéticos de la enfermedad entre los que se encuentra el hábito de fumar, un índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física y consumo de alcohol. El consumo de tabaco es el factor de riesgo más importante con un 20 % de incidencia en las muertes mundiales por cáncer en general y un 70 % de incidencia en las muertes por cáncer de pulmón.⁴

La transformación de una célula normal en cancerosa es un proceso en el que intervienen diferentes factores, desde genéticos hasta ambientales. Dentro de este último podemos describir tres categorías entre las que se encuentran los carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioletas de los rayos del sol, los carcinógenos químicos, como el humo del tabaco, y los carcinógenos biológicos como las infecciones causadas por determinadas bacterias, parásitos y virus.⁵

Los cánceres asociados a infecciones de tipo virales como el papiloma virus humano (PVH), la hepatitis B (VHB) y la hepatitis C (VHC) son las responsables de hasta un 20 % de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios, las cuales se pudieran prevenir con el uso del condón.⁵ Las aflatoxinas son un tipo de toxinas producidas por ciertos hongos en cultivos agrícolas como el maíz, el maní o cacahuates, la semilla de algodón y los frutos secos de cáscara dura como las nueces.⁶

Con el desarrollo de las ciencias y el aumento de las esperanzas de vida en la población mundial se trae aparejado un envejecimiento de la población, la cual se triplicará en la cantidad de personas mayores de 80 años entre los años 2015 y 2050, llegando a los 446.6 millones, contra los 126.4 millones del 2015.⁷ El envejecimiento de la población es otro factor de riesgo en la aparición del cáncer ya que la incidencia de la enfermedad aumenta con la edad debido a la acumulación de los factores de riesgo, entre los que se encuentran los mecanismos de reparación celular que van perdiendo eficacia con el envejecimiento.⁸ Por los que los gobiernos de los países deben tener estos factores en cuenta a la hora del diseño de políticas de salud.

La detención temprana del cáncer, un diagnóstico acertado y un tratamiento efectivo son de ayuda esencial para incrementar la sobrevida por cáncer y la calidad de vida del paciente. Para la industria farmacéutica el cáncer es uno de los principales blancos para el desarrollo de nuevos compuestos que ayuden a paliar la enfermedad. El diagnóstico acertado y tempranos de las células tumorales es un paso fundamental para el tratamiento el cual puede abarcar una o varias modalidades como la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia. Algunas de los tipos más comunes de cáncer como el mamario, el cervicouterino, el bucal y el de próstata tienen tasas de curación elevadas si se detentan tempranamente.⁹

Dos de las primeras líneas de combate terapéuticas utilizadas en el tratamiento del cáncer son la quimioterapia y la radioterapia. La quimioterapia consiste en la utilización de drogas que son diseñadas para eliminar las células cancerígenas. Una o más drogas, denominadas citotóxicas o antineoplásicas, son administradas por vía oral o intravenosa, las mismas actúan sobre las células que se están dividiendo rápidamente, principal característica de las células cancerígenas. Algunas células normales también se dividen de forma rápida, como las del folículo piloso o las del tracto digestivo, las cuales son dañadas también cuando se utiliza la quimioterapia y están entre los efectos colaterales de las mismas. Por su parte el tratamiento de radioterapia se refiere a cuando se utilizan altas dosis de radiaciones que pasan a través de la piel a zonas específicas donde se localiza el tumor, dañando el ADN de las células tumorales y la muerte de las mismas con efectos colaterales localizados.¹⁰

La segunda línea para la eliminación del cáncer son las terapias específicas dirigidas, que consisten en fármacos desarrollados concretamente para eliminar este tipo de células y son el producto del diseño racional de medicamentos. Entre los métodos que se han desarrollado para el diseño de estas moléculas se encuentra el de comparar las proteínas de las células cancerosas con las células normales y en base a estas diferencias diseñar compuestos que sean específicos contra los tumores. Uno de los principales blancos en este sentido es la proteína del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano, HER-2. En este sentido se han desarrollado anticuerpos monoclonales que bloquean la unión de su ligando, el Factor de Crecimiento Epidérmico EGF al HER-2. Entre los principales medicamentos en el mercado que cumplen esta función están el trastuzumab (comercializado con la marca Herceptin® por Roche)¹¹ y el Nimotuzumab o CIMAhher desarrollado por el Centro de Inmunología Molecular de la Habana, Cuba.¹²

Otra alternativa para la búsqueda de nuevos blancos moleculares es determinar si las células cancerosas producen proteínas con mutaciones que conducen al avance del cáncer. Cuando se logra identificar un blanco terapéutico en las células cancerígenas el paso siguiente sería el diseño de una terapia que solo afecte a este tipo de células frenando su crecimiento. Se han desarrollado varias de estas terapias dirigidas que incluyen terapias de tipos hormonales, moduladores de la expresión de genes, inductores e inhibidores de la apoptosis, inhibidores de la angiogénesis, inmunoterapias y moléculas para transportar toxinas y además de los inhibidores de transducción de señales en el interior de la célula.

Los Inhibidores de la traducción de señales bloquean el proceso por el que una célula responde a señales de su entorno.

Investigaciones previas has sugerido que la fosforilación de proteína quinasa 2 es un evento bioquímico relacionado con la oncogénesis en humanos. En las células tumorales derivadas del epitelio pulmonar y cervicouterino se han encontrado altos niveles de actividad de la enzima casein quinasa CK2, que se asocian a la transformación maligna y comportamiento agresivo de las células. En este sentido se diseñó el péptido CIGB-300 en el CIGB de la Habana para unirse directamente al dominio ácido conservado fosfoaceptor de los sustratos de CK2, y así inhibir su actividad.¹³

Los anticuerpos monoclonales son otras de las herramientas farmacológicas más utilizadas al día de hoy en la lucha contra el cáncer con excelentes resultados clínicos, La estrategia de usar los anticuerpos monoclonales para el tratamiento contra el cáncer, fue descrita a finales de los años 70 con la promesa que podrían ser desarrollados en las terapias que eran altamente específicas a las células cancerosas, matándoles con pocos o ningunos efectos secundarios. Para varios tipos de cáncer, los anticuerpos monoclonales han ofrecido ya esta ventaja a los pacientes. Para otros tipos del cáncer, han proveído de un arma terapéutica adicional, pero con ventajas más pequeñas y a veces nuevos efectos secundarios.¹⁴

Los inhibidores de la angiogénesis es otro de los mecanismos que se tratan de bloquear para inhibir el desarrollo tumoral. Un suministro de sangre es necesario para que los tumores crezcan más de cierto tamaño, porque provee el oxígeno y nutrientes que necesitan los tumores para un crecimiento continuo. Los tratamientos que interfieren en este proceso angiogénicos tienen como moléculas blancas interferir en la acción del Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF), que estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos hacia el tumor.¹⁵

Las vacunas contra el cáncer es otra de las terapias alternativas y se clasifican dentro de los productos biotecnológicos que se conocen como modificadores de la respuesta biológica, ya que estimulan la capacidad del sistema inmune para combatir infecciones. Pueden ser de dos tipos, las preventivas o profilácticas que son las que van a impedir en personas sanas que se desarrolle el tumor y aquí contamos en el mercado las vacunas contra el Virus del Papiloma Humano (VPH), por sus subtipos de alto riesgo que pueden causar cáncer de cuello uterino, cáncer de ano, cáncer de orofaringe y cánceres de vagina, de vulva y de pene. Algunas vacunas están aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para prevenir la infección por VPH: Gardasil® de Merck & Co y Cervarix® comercializada por GlaxoSmithKline (GSK)

La infección crónica por el virus de la Hepatitis B puede conducir a cáncer de hígado. La FDA ha aprobado muchas vacunas que protegen contra la infección por el VHB. Dos vacunas, Engerix-B y Recombivax HB, protegen solo contra la infección por VHB, al igual que Heberbiovac.¹⁶ En abril de 2010, la FDA aprobó la primera vacuna de tratamiento es manufacturada por Dendreon Corporation, y es una terapia celular personalizada que funciona programando el sistema inmune de cada paciente para estimular una respuesta inmunitaria a la fosfatasa ácida prostática (PAP), un antígeno que se encuentra en la mayoría de las células cancerosas de próstata. En estudios clínicos, sipuleucel-T aumentó cerca de cuatro meses la supervivencia de hombres con cierto tipo de cáncer metastático de próstata.¹⁷

El otro tipo de vacuna es la de tratamiento o terapéutica las cuales tienen como objeto el tratamiento de un cáncer existente al reforzar la respuesta inmunitaria natural del cuerpo contra el tumor. Las vacunas de tratamiento son una forma de inmunoterapia y entre ellas se encuentra CIMAvax EGF desarrollada en Cuba¹⁸ para su uso en pacientes adultos con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) en etapas IIIB/IV. La vacuna se basa en la inmunoterapia activa; o sea, manipula la respuesta inmune de un individuo para que genere sus propios anticuerpos efectores (Acs) contra el EGF.¹⁹

El mecanismo de senescencia celular es la interrupción estable de la proliferación celular, donde ocurre una detención del ciclo celular estable y se caracteriza por un metabolismo activo, la secreción de factores inmunomoduladores y activación de vías supresoras de tumores. Este proceso se pone en marcha mediante distintos activadores moleculares como oncogenes activados y un exceso de gene-

raciones durante la división celular. Las células senescentes secretan una combinación de reguladores inflamatorios y estromales (el fenotipo secretor asociado a la senescencia) que influyen en el comportamiento de las células cercanas, incluidas las inmunitarias. Existen indicios sólidos de que la senescencia celular es un mecanismo de supresión tumoral potente. La comunidad científica sabe que ésta es una fase irreversible de la vida de una célula, pero su intención es conocer este proceso en un mayor grado. La senescencia podría ser una de las causas del envejecimiento que evolucionó para prevenir el crecimiento descontrolado de células, lo que se conoce como cáncer y que será evaluado a continuación por el grupo del Dr. Gerardo Ferbeyre de la Universidad de Montreal en el primer artículo de investigación de este número de la Revista Bionatura.

Referencias bibliográficas

1. World Cancer Report 2014.
2. <http://globocan.iarc.fr/old/method/method.asp?country=218>
3. <https://www.saludsa.com/vivesaludtotal/index.php/cancer/el-cancer-en-el-ecuador/423-el-cancer-en-el-ecuador> Dra. Patricia Cueva, epidemióloga. Directora del Registro Nacional de Tumores, SOLCA Quito. Hospital SOLCA Quito, Av. Eloy Alfaro N53-94 y Los Pinos.
4. <http://www.who.int/cancer/prevention/en/>
5. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology* 2012;13: 607-615
6. Food and Drug Administration. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins, Second Edition. Laurel, MD: Food and Drug Administration, 2012. Disponible también en línea. Fecha más reciente de consulta: 12 de diciembre de 2014.
7. <http://www.who.int/ageing/publications/world-report-2015/en/>
8. García Osorio, F. (2016). New biological mechanisms and intervention strategies in aging and cancer.
9. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
10. García, M. G., Rodríguez, O. G. A., & Gómez, J. H. (2016). Tratamiento del cáncer: Oncología médica, quirúrgica y radioterapia. Editorial El Manual Moderno.
11. Shak, Steven. "Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group." *Seminars in oncology*. Vol. 26. No. 4 Suppl 12. 1999.
12. Suarez-Martínez, G., & Bencomo-Yanes, A. (2014). Nimotuzumab, inmunoterapia eficaz para el tratamiento de tumores epiteliales malignos. *Biotecnología Aplicada*, 31(2), 159-167.
13. Perea, Silvio E., et al. "Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2)." *Cancer research* 64.19 (2004): 7127-7129.
14. López-Requena, A., De Acosta, C. M., Moreno, E., González, M., Puchades, Y., Talavera, A., ... & Pérez, R. (2007). Gangliosides, Ab1 and Ab2 antibodies: I. Towards a molecular dissection of an idiotype-anti-idiotypic system. *Molecular immunology*, 44(4), 423-433.
15. Ordás, H. L., Cowley, J. V. G., Avila, M. A., Dorantes, G. R., Díaz, Y. M., Cruz, O. G., ... & Vispo, N. F. S. (2007). U.S. Patent Application No. 12/447,711.
16. Estévez, Z. C., Betancourt, A. A., González, V. M., Baile, N. F., Silva, C. V., Bernal, F. H., ... & Batista, L. L. (2007). Immunogenicity and safety assessment of the Cuban recombinant hepatitis B vaccine in healthy adults. *Biologicals*, 35(2), 115-122.
17. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *New England Journal of Medicine* 2010;363(5):411-422.
18. Rodríguez, P. C., Popa, X., Martínez, O., Mendoza, S., Santiesteban, E., Crespo, T., ... & de la Torre, A. (2016). A Phase III Clinical Trial of the Epidermal Growth Factor Vaccine CIMAvax-EGF as Switch Maintenance Therapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, clincanres-0855.
19. Rodríguez, P. C., Rodríguez, G., González, G., & Lage, A. (2010). Clinical development and perspectives of CIMAvax EGF, Cuban vaccine for non-small-cell lung cancer therapy. *MEDICC Rev*, 12(1), 17-23.

Dr. Nelson Santiago Vispo

Editor Revista Bionatura

www.revistabionatura.com

Email. editor@revistabionatura.com

Profesor - investigador Yachay Tech. Ecuador / nvispo@yachaytech.edu.ec

Avances en investigación clínica en Ecuador

Advances in clinical research in Ecuador

Karina Alexandra Castro, Luis Santiago Escalante

DOI. 10.21931/RB/2016.01.02.2

RESUMEN

Ecuador tiene condiciones favorables para fomentar el desarrollo de la investigación clínica garantizar la seguridad de los participantes y la calidad de la misma. El gobierno está abierto para impulsar el desarrollo de la investigación clínica que se enmarca en las prioridades nacionales y ha contribuido con importantes recursos para su promoción.

Palabras clave: ensayos clínicos, Ecuador

ABSTRACT

Ecuador has favorable conditions to encourage the development of clinical research ensuring the safety of participants and the quality of it. The government is opened to boost the development of clinical research that is framed in national priorities and has contributed with significant resources to promote it.

keywords. clinical trials, Ecuador

Introduction

Los principales elementos para desarrollar una infraestructura para investigación en salud, según el Global Health Research Report 2000, son: a) infraestructura organizacional para el desarrollo e implementación de proyectos de investigación, b) investigadores con experiencia y conocimiento en metodología de la investigación; y c) regulación y políticas del país que enfatizan la importancia de la investigación clínica para mejorar la salud.¹

1. Infraestructura institucional en Ecuador para el desarrollo de proyectos de investigación.

El Ministerio de Salud Pública del Ecuador, responsable de organizar y controlar los Comités de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH), ha fomentado el fortalecimiento de los CEISH generando, con énfasis desde el 2014: normativa, capacitación e inspecciones. Existen siete CEISH concentrados en las dos principales ciudades de Ecuador: Quito y Guayaquil. La ejecución de ensayos clínicos se soporta en redes de trabajo para coordinar sitios clínicos tanto de centros de investigación públicos y privados.

Ecuador creó en el año 2012, la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (Arcsa), quien autoriza la ejecución de ensayos clínicos en el país, de los estudios que han sido previamente aprobados por un comité de ética de investigación en seres humanos, CEISH.

Ecuador cuenta con: 1) instituciones estatales que regulan y coordinan la investigación en salud; 2) universidades con facultades de ciencias de la salud que promueven investigación, ya que políticas de gobierno condicionan la acreditación de las universidades a indicadores de investigación; 3) empresas públicas como Yachay, que están empeñadas en desarrollar investigación en salud; 4) un Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública en consolidación; 5) una red de CEISH independientes, 6) centros de investigación públicos y privados.

2. Investigadores con conocimiento y experiencia en metodologías de investigación en salud.

Ecuador incrementó en 3.6 veces más, los investigadores vinculados a los institutos públicos de investigación científica; la inversión en proyectos de investigación científica creció de 3 519.067,50 dólares en el 2007 a USD 32'341.544,97 en el 2013.² En los últimos años se ha desarrollado el Proyecto Prometeo como iniciativa del gobierno ecuatoriano, que busca fortale-

cer la investigación, la docencia y la transferencia de conocimientos en temas especializados, a través de la vinculación de investigadores extranjeros y ecuatorianos residentes en el exterior.

3. Ecuador, regulaciones y política para desarrollar investigación en salud.

Ecuador, a través del Ministerio de Salud Pública, MSP, definió sus prioridades de investigación en salud para el periodo 2013-2017, de manera participativa.³ Emitió en julio de 2014, el Acuerdo 4889 del MSP, para promover la conformación de CEISH, y tiene en fase de validación final la normativa sanitaria para aprobación de ensayos clínicos con medicamentos, el cual se espera emitir en el 2016. ARCSA toma como referencia para la autorización de ensayos clínicos en el país, instrumentos internacionales como las Guías de Práctica Clínica y la Declaración de Helsinki.

Ecuador presenta condiciones propicias para fomentar el desarrollo de investigación clínica que garantice la seguridad de los participantes y la calidad de la investigación. El gobierno tiene apertura para fomentar el desarrollo de investigación clínica que esté enmarcada en las prioridades nacionales y ha contribuido con importantes recursos para fomentarla.

Referencias bibliográficas

1. Global Forum for Health Research 2000. The 10/90 Report on Health Research 2000. [Online]. Available from: http://announcementsfiles.cohred.org/gfhr_pub/assoc/s14791e/s14791e.pdf [Accessed: june, 2015].
2. Ministerio Coordinador de Conocimiento y Talento Humano, Declaraciones del Secretario Nacional de Ciencia y Tecnología del Ecuador, Available from: <http://www.conocimiento.gob.ec/> [Accessed: december, 2015].
3. Prioridades de Investigación de Salud para Ecuador, Ministerio de Salud Pública. Available en: http://instituciones.msp.gob.ec/images/Documentos/varios/PRIORIDADES_INVESTIGACION_SALUD2013-2017.pdf. [Accessed: january, 2016].

Recibido: 16 de febrero de 2016.

Aprobado: 1 de marzo de 2016.

Genome reprogramming in cells that escape from senescence

Reprogramación del genoma en células que escapan de la senescencia

Xavier Deschênes-Simard¹, Stéphane Roy², Gerardo Ferbeyre³

DOI. 10.21931/RB/2016.01.02.3

ABSTRACT

Many tumorigenic stimuli trigger a protective cellular response known as cellular senescence, a stable cell cycle arrest characterized by an active metabolism, secretion of immunomodulatory factors and activation of tumor suppressor pathways. The senescence state depends on the continuous and aberrant activation of signalling pathways. Senescent cells will remain non-dividing as long as this aberrant signalling is maintained. However, if these signals are attenuated, senescent cells can escape from their dormant condition and dangerously progress into tumor formation. Here we compare the transcriptome of oncogenic Ras-induced senescent cells with that of cells that escaped from senescence after attenuation of the ERK/MAP kinase signaling pathway. We found that cells that escaped from senescence express genes associated to genetic instability and display a highly aberrant karyotype. These cells also express genes commonly altered in the cancer transcriptome of different tissues supporting the idea of a common gene expression program that governs cancer cells. Bioinformatic analyses identified the transcription factors most likely regulating the gene expression programs of senescent cells and cells that escape from senescence. We propose a model of carcinogenesis where cells that escape from senescence provide a heterogeneous population of genetically unstable cells that can progress into malignant tumors.

Keywords: Senescent, tumor suppressor, immunity.

RESUMEN

Muchos estímulos tumorigénicos desencadenan una respuesta celular protectora conocida como senescencia celular, la cual es una detención estable del ciclo celular caracterizada por un metabolismo activo, la secreción de factores inmunomoduladores y la activación de vías de supresión de tumores. El estado de senescencia depende de la activación continua y aberrante de las rutas de señalización. Las células senescentes permanecerán sin dividirse el tiempo que se mantiene esta señalización aberrante. Sin embargo, si se atenúan estas señales, las células senescentes pueden escapar de su condición inactiva y peligrosamente progresar a la formación de tumores. Aquí comparamos el transcriptoma de las células senescentes oncogénicas inducidas por Ras, con el de las células que escaparon de la senescencia después de la atenuación de la vía de señalización de la quinasa / ERK MAP. Encontramos que las células que escaparon de la senescencia expresan los genes asociados a la inestabilidad genética y muestran un cariotipo altamente aberrante. Estas células también expresan genes comúnmente alterados en el transcriptoma de diferentes tejidos cancerígenos que apoyan la idea de un programa de expresión génica común que regula las células cancerosas. Los análisis bioinformáticos identificaron los factores de transcripción más probable que regulan los programas de expresión génica de células senescentes y células que se escapan de la senescencia. Nosotros proponemos un modelo de carcinogénesis donde las células que se escapan de la senescencia proporcionan una población heterogénea de células genéticamente inestables que pueden progresar en tumores malignos.

Palabras clave: senescencia, supresor de tumores, inmunidad.

Introduction

Cellular senescence is a tumor suppressor mechanism with the potential to permanently halt tumor progression or recruit immunity effectors that eliminate cells with the prospective to form malignant tumors.^{1,2} Senescent cells are present in premalignant lesions of the prostate^{3,4} and the pancreas^{5,6} that usually progress to malignant tumors. They are also abundant in benign lesions that rarely become cancerous such as nevi⁷⁻⁹ and benign prostatic hyperplasia.^{10,12} The events that allow escaping from senescence in some lesions but not in others remain to be established. Since senescence is identified using a limited set of biomarkers it is plausible that senescent cells that can progress into cancers while those that remain permanently arrested are two

distinctive cellular states. High levels of ERK kinases activity can permanently impair cell proliferation and they may define irreversible senescence.¹¹

Mammary epithelial cells can spontaneously escape from senescence¹³ and this has been linked to a downregulation of the ERK pathway.¹¹ In a model of Ras-induced senescence in human fibroblasts we previously reported that downregulation of ERK allows to bypass senescence and in combination with expression of telomerase leads to malignant transformation.¹¹ Several studies have concluded that Ras-signaling through the ERK kinases is important for transformation and tumor progression.¹⁴ However, in multiple tissues the most malignant tumors have very low levels of ac-

¹ Faculty of Medicine, McGill University, Montréal, Québec, H3G 1Y6, Canada.

² Department of Stomatology, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada.

³ Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada.

Correspondence: g.ferbeyre@umontreal.ca

tivated ERK, thereby indicating a more complex relationship between these kinases and cancer.¹⁴ To get insights into the process of malignant transformation in cells that escape from senescence we report here a transcriptome analysis of cancer cells obtained after bypassing senescence by reducing ERK activity in comparison with its premalignant senescent precursors that have very high levels of activated ERK.

Methods

Cells, experimental cell biology, protein analysis and cytogenetics

Normal human diploid fibroblasts IMR90 were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Wisent, Montréal, QC) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Wisent) and 1% penicillin G/streptomycin sulfate (Wisent). Retroviral gene transfer, senescence biomarkers, immunoblotting and RNA purification were done as described previously.¹¹ Karyotypic analysis were performed by the cytogenetics platform of the Quebec Leukemia Cell Bank (<http://bclq.org/>).

Microarray and bioinformatic analysis

Microarray analysis was performed on total RNA purified from three independent samples of senescent cells or cells that escaped from senescence due to the expression of shERK2. We used the service of Genome Québec Innovation Centre. Microarray data files from triplicates of both conditions were analysed with the FlexArray 1.6.3 software (<http://genomequebec.mcgill.ca/FlexArray>)¹⁵ using Affymetrix default analysis settings. Raw data was deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible through the accession number GSE33613. Biological functions were analysed using the platform DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>)¹⁶ or Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) software.¹⁷ GSEA computes a Normalized Enrichment Score (NES) that reflects the degree to which a test gene set is overrepresented in upregulated or downregulated genes of another gene set. The significance of NES is mainly affected by the False Discovery Rate (FDR; q-value).¹⁷ We considered significant gene sets with a p-value ≤ 0.05 and a q-value ≤ 0.25 . To predict transcription factors regulating a particular set of genes we used the Distant Regulatory Elements of Co-regulated genes (DIRE) web-based application.¹⁸

Results

Global analysis of transcriptome changes in cells that escape from Ras-induced senescence

To compare the senescent cells transcriptome with cells that escape from senescence becoming malignant we first expressed the human telomerase gene hTERT in normal diploid human fibroblasts IMR90. Then, we introduced oncogenic *Ras* in these cells and either a shRNA control or a shRNA against ERK2 (Fig. 1A). *Ras* induced a strong senescence phenotype in cells with shRNA control but cells where ERK2 was downregulated massively escaped from senescence and displayed a transformed morphology (Fig. 1B). We then prepared total RNA from these two cell populations and obtained their transcriptome profile by microarray analysis using the service of Genome Québec (<http://gqinnovationcenter.com/index.aspx?l=e>). A total of 1048 transcripts with a fold change higher or equal to 2 and a p < 0.05 according to a two-sample Student's t-test were used for a bioinformatics analysis with the DAVID platform (<https://david.ncifcrf.gov/>).¹⁶ As expected, cells that escaped from senescence express high levels of genes annotated for functions such as the cell cycle (p=5.0E-60), chromosome organization (p=9.0E-38), DNA repli-

cation (p=5.5E-27), mitosis (p=1.4E-54), and DNA metabolism (p=4.3E-22) (Fig. 1C). Since most of these genes are regulated by RB/E2F complexes, their increase in cells that escape from senescence suggest that they can efficiently disable the RB protein, thereby releasing its inhibitory activity over the E2F transcription factors. On the other hand, senescent cells expressed many genes coding for proinflammatory (p= 3.6E-7) and secreted factors (p=6.1E-13) (Fig. 1D), which is a characteristic that has been well documented in many other studies of the transcriptome of senescent cells.¹⁹

Unexpectedly, senescent cells expressed a series of keratinization genes clustered in chromosome 1q21 (Fig. 1D). They include multiple late cornified envelope genes and several small proline-rich proteins (Fig. 1E). These proteins form a cornified envelope under the plasma membrane of differentiated keratinocytes and contribute to the barrier function of the skin.²⁰ Their role in senescence remains to be investigated but the fact that p53 regulates their expression suggest that they may be part of the overall tumor suppression functions of senescence.²¹ Intriguingly, other genes located at 1q21 were also upregulated in senescent cells and they include *CTSS*, *TUFT1*, *SMCP*, *S100A8*, *IVL*, *HEP-HL1*, *CRCT1*, *C1orf46* and the long non-coding RNA LINC00302. The differential expression of these genes between senescent cells and cells that escape senescence can be easily visualized using the GEO2R program available at the GEO site containing our microarray data. Our GEO accession number is GSE33613 and one example for differential gene expression found with GEO2R is shown for LINC00302 in Fig. 1F.

Gene set enrichment analysis of gene expression changes that accompany senescence escape

A pathway controlling a particular cellular function is regulated by multiple genes. Small changes in many of those genes can have a strong effect on the final output but are ignored by only considering genes with substantial changes in expression. To circumvent this problem, gene sets has been defined for multiple biological categories. DAVID, the bioinformatics program used above, uses gene sets as defined by the Gene Ontology project. This method ignores genes that may play a role not yet discovered in a biological process and is therefore biased. Gene set enrichment analysis (GSEA) compares microarray data to gene sets defined by previous microarrays studies. It thus determines whether members of a gene set are enriched at the top or the bottom of the gene expression data.¹⁷ GSEA considers all genes in the microarray data without arbitrary cut-off based on fold change or significance.

We used GSEA to compare the transcriptome data from both senescent cells induced by oncogenic *Ras* and cells that escaped from this senescence after inhibition of ERK by and shRNA. We found that several gene sets were significantly enriched in Ras-induced senescent cells compared to cells that bypassed senescence (Fig. 2). First, there was an overlap with the senescent gene set defined by Fridman and Tainsky (77 genes) from multiple microarray studies²² (Fig. 2A). Of note, previous data on the transcriptome of senescent cells compared control cells with senescent cells that were not treated to induce senescence.²² We rather compared senescent cells with cells expressing the same stressor (oncogenic *Ras*) but which escaped from senescence, thereby refining the senescence gene signature to 20 genes. This list includes PEA-15, a gene that controls the localization of the ERK kinases in senescent cells.²³ A set of these genes is highly expressed in preneoplastic lesions of the prostate (Fig. 2B), which is consistent with the concept that senescent cells constitute a barrier for tumor progression and form the bulk of preneoplastic lesions.^{3, 5, 12, 24-26} Cell cycle and DNA repair genes were found downregulated in senescent cells (Fig. 2C and 2D) in agreement with previous studies showing that the retinoblastoma tumor suppressor pathway repress the E2F transcription factors required

for the expression of these genes.^{12,27} Autophagy-dependent protein degradation was found to be highly active in senescent cells²⁸ explaining the high expression of lysosomal genes observed in our study (Fig. 2E). We also found significant overlap with a gene set of cytokines (Fig. 2F) and a gene set of genes regulated by reactive oxygen species (Fig. 2G). Senescent cells are characterized by mitochondrial dysfunction and production of high levels of reactive oxygen species explaining the induction of ROS-responsive genes.^{29,30}

Cells that escape from senescence due to ERK downregulation show a decreased expression of many genes in the set

KRAS.300_UP.V1_UP that contains genes upregulated in epithelial cells expressing oncogenic KRAS (Fig. 3A). These genes may represent the ERK-dependent targets of the KRAS signalling pathway. Surprisingly, cells that escape senescence also upregulate many genes highly expressed in cells transformed by KRAS (Fig. 3B) or genes that were downregulated by salirasib, a RAS inhibitor (Fig. 3C).³¹ Taken together, the results suggest that the gene expression signature that underlies Ras-dependent transformation does not require high levels of ERK activation. It is also intriguing that cells that escape from senescence express genes linked to the adipogenic conversion of mouse fibroblasts 3T3-L1

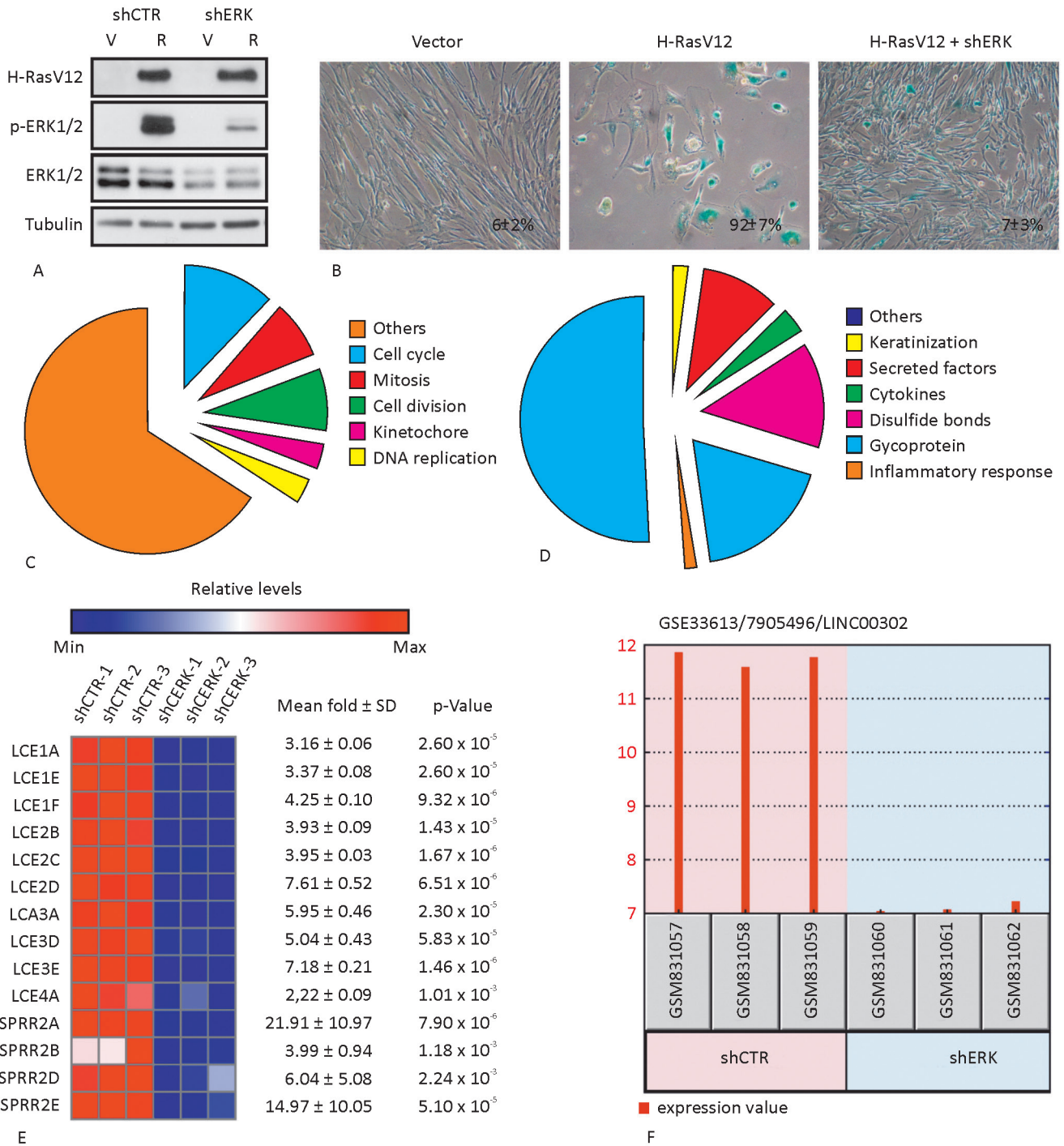


Fig. 1. Changes in global gene expression patterns in human fibroblasts that escape from senescence. (A) Immunoblots for the indicated proteins in IMR90 cells expressing oncogenic Ras (R) or a vector control (V) and either an shRNA control (shCTR) or an shRNA targeting ERK2 (shERK). (B) Senescence-associated β-galactosidase of IMR90 cells expressing the indicated vectors. The percentage and standard deviation of SA-b-Gal positive cells is indicated in each panel. (C and D) Bioinformatics analysis of gene expression data with the platform DAVID. (C) Most significant annotation clusters for genes upregulated in cells that escape from senescence. (D) Most significant annotation clusters for genes downregulated in cells that escape from senescence. (E) Senescent cells express high levels of keratinization genes that cluster at the chromosome locus 1q21. (F) GEO2R allows retrieving microarray data for selected genes. Here the long non-coding RNA LINC00302 is shown as an example.

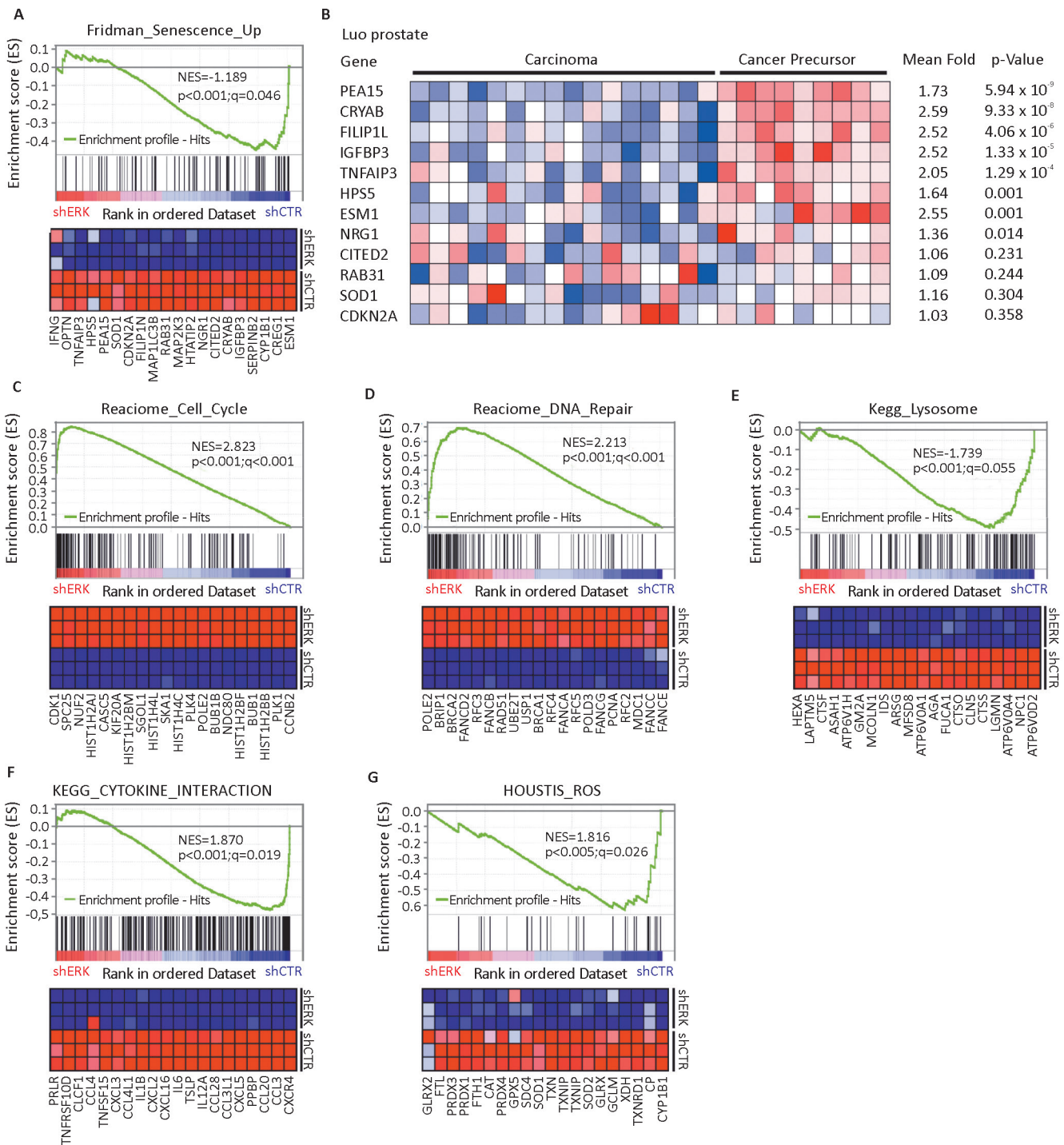


Fig. 2. Gene set enrichment analysis (GSEA) of genes highly expressed in senescent cells in comparison with cells that escaped from senescence. (A and C-G) In each panel, the enrichment score (ES) along the data set is shown on the x axis of the graphic. Each vertical bar represents a gene, and genes enriched in either condition are at the right (shERK) or left (shCTR) parts of the graph. The normalized enrichment score (NES), the p-value and the false discovery rate (q-value) are indicated in the insert. At the bottom, each panel shows a heat map with the top 20 genes that are highly expressed (red) in either the shERK (escape from senescence) condition or the shCTR (senescent) condition. (B) Heat maps obtained from Oncomine showing the expression of several genes of the Fridman senescent signature (panel A) in samples from benign and malignant prostate tumors.

(Fig. 3D). Ras signalling is known for stimulating adipogenesis in this system while the ERK kinases oppose this process,³² thus indicating another cellular response controlled by RAS that is not dependent on the ERK MAP kinases. The genes that matched between cells that escape from senescence and adipogenesis likely represent genes required for genome reprogramming since they have been shown to be expressed transiently as a cluster during the first hours of conversion of fibroblasts into adipocytes.³³

A network of 118 genes associated to a higher risk of breast cancer (XPRSS-Int network) includes several genes involved in

centrosome functions.³⁴ Cells that escaped from senescence have an enrichment of this gene set (Fig. 3E) suggesting that they may also undergo centrosome dysfunction and chromosome instability. We thus analysed the karyotype of cells that escaped from senescence due to ERK inhibition and observed a composite karyotype (cp) with hyperdiploid cells (65-90 chromosomes) and multiple chromosomal aberrations. On the other hand, tumors recovered from mice injected with these cells show a more homogenous chromosome distribution. This suggests that chromosome instability is an inherent property of cells that escape

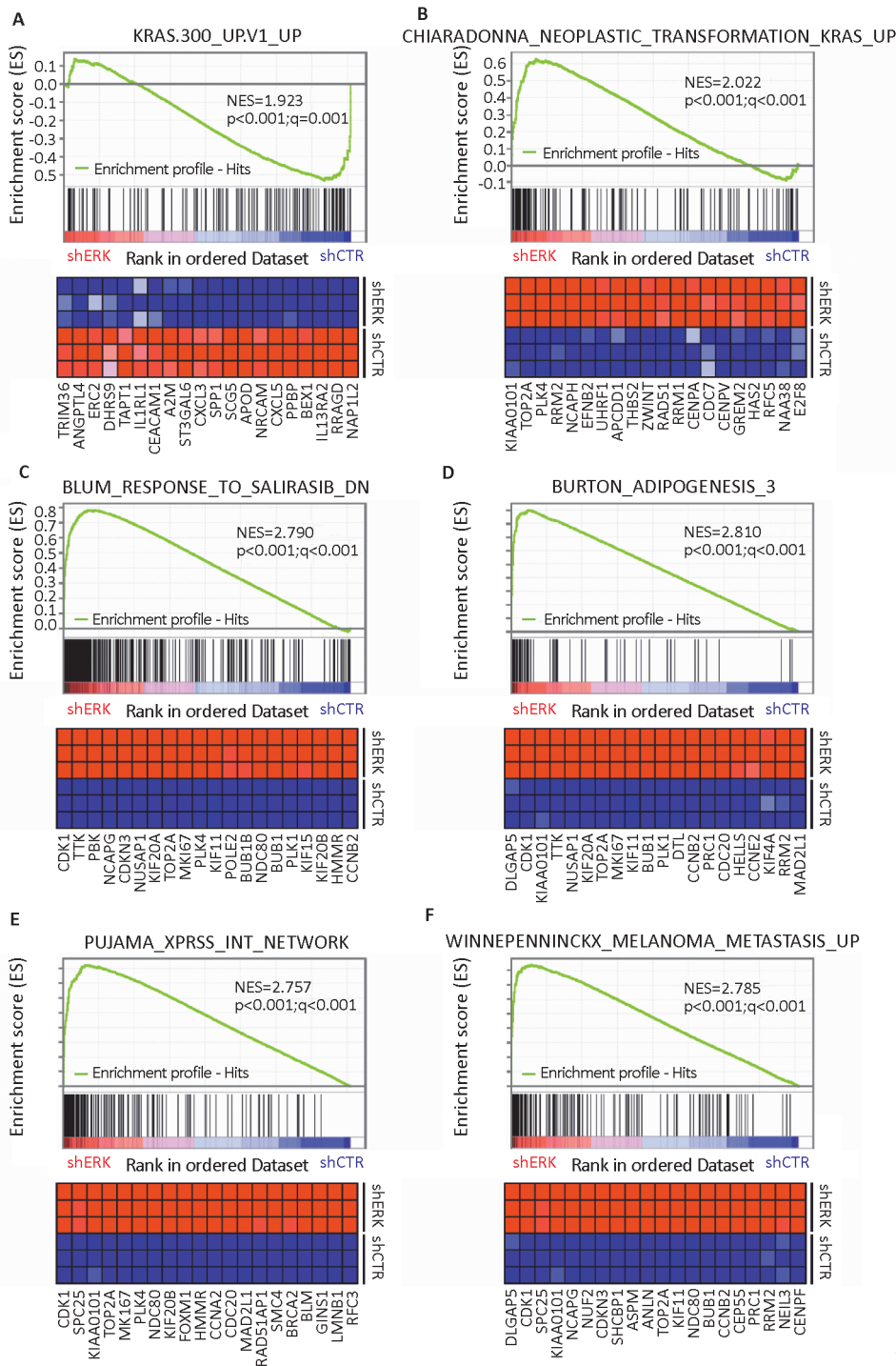


Fig. 3. Gene set enrichment analysis (GSEA) of genes highly expressed in cells that escaped from senescence in comparison with senescent cells. (A-F) As described for Fig. 2.

from senescence and that *in vivo* tumor growth selected for clones with more stable karyotypes. Intriguingly, all cells recovered from mice lost one X chromosome (Table). Loss of the inactive X chromosome has been frequently observed in cells from breast cancer.³⁵ Remarkably, many of the genes highly expressed in cells that escaped from senescence and which also overlapped with the adipogenesis program and the XPRSS-Int network matched to a gene set associated to metastatic melanoma (Fig. 3F). Together, these results suggest that cells escaping from senescence are highly tumorigenic. In fact, in previous work, we demonstrated that these cells form aggressive tumors in mice.¹¹

Identification of transcription factors regulating the escape from senescence

To identify candidate transcription factors that could explain the gene expression changes observed between senescent cells and

cells that escaped from senescence, we first used the web-based platform DIRE.¹⁸ The top transcription factors associated to genes upregulated in senescence was JUN (Fig. 4A), which is consistent with previous work placing the AP1 (JUN/FOS) transcription factor downstream of the ERK kinases in multiple cellular responses including cell differentiation.^{36,37} The senescence regulators p53³⁸ and NF- κ B³⁹ were also identified by the algorithm. As expected, transcription factors of the E2F family dominated the list associated to genes upregulated after senescence escape (Fig. 4B), indicating that inhibition of the retinoblastoma checkpoint is a key property of growing cells.^{12,27} Interestingly, the transcription factor S8, also known as PRRX2, came second in this list. PRRX2 was recently linked to the TGF β pathway and conferred poor prognosis to breast cancer patients.⁴⁰ Using the PrognScan webserver we found that PRRX2 also conferred bad prognosis to patients with lung and bladder cancer (Fig. 4C and 4D).

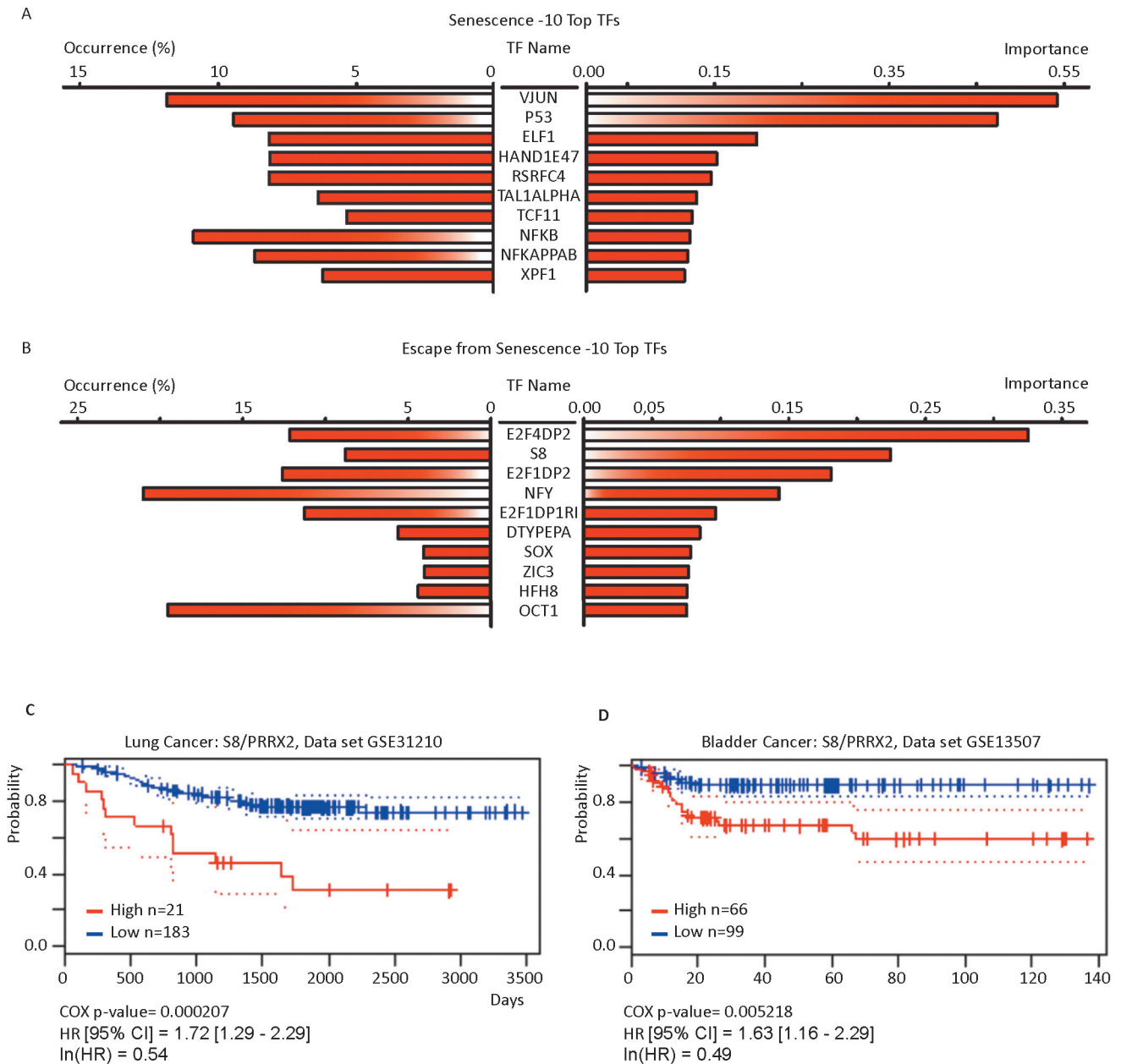


Fig. 4. Transcription factors associated to the transcriptome of senescent cells and cells that escape from senescence according to the algorithm DIRE. (A and B) The percentage of target genes found in the submitted list of transcripts is shown for each potential TF (occurrence). The importance indicates the product of a TF occurrence with its weight in the database. (A) Top transcription factors associated to senescent cells. (B) Top transcription factors associated to cells that escape from senescence. (C and D) Kaplan-Meier and survival analysis using Cox regression which indicates that high expression of PRRX2 is associated to lower survival in lung and bladder cancer.

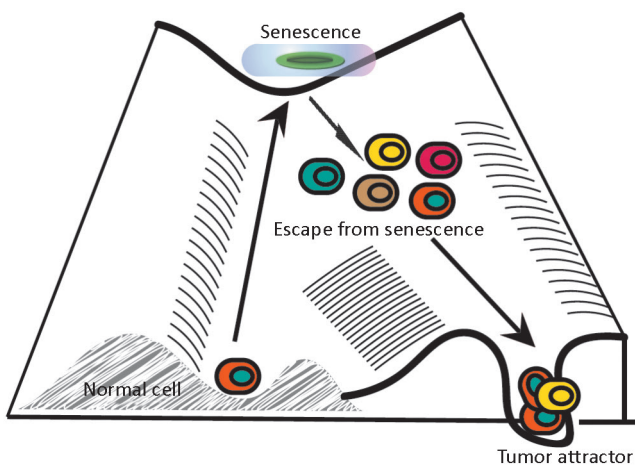


Fig. 5. Model of carcinogenesis. Escape from senescence may create a population of unstable cells that can progress into a default proliferative state dubbed the cancer attractor. Therapies that can restore the normal microenvironmental cues might redirect cells that escaped senescence into normal differentiated cells, thus preventing carcinogenesis at its early stages.

Discussion

Our gene expression analyses of cells escaping from senescence uncover two apparently contradicting features. First, cells that escape from senescence have multiple genomic abnormalities judging from their highly aberrant karyotype and the expression of genes associated to chromosome instability. The molecular mechanism explaining why cells that escape from senescence exhibit genomic instability remains to be characterized but it could be the consequence of reduced ERK activity. Consistent with this explanation, MEK inhibitors induced genomic instability in glioblastoma cell lines.⁴¹ Second, these cells express a common core of cancer genes previously reported in multiple transcriptomes of cancer cells. The data can be rationalized into a model of carcinogenesis where the escape from senescence provides an initial cellular heterogeneity upon which selective forces act to shape the final cellular composition of the tumor. However, and despite this heterogeneity, these cells converge towards a gene expression program that acts as a universal “cancer attractor”⁴² (Fig. 5). This attractor operates in different tissues and in cells growing in Petri dishes suggesting that it is an intrinsic genomic response to signals commonly generated in all those dissimilar conditions.

More than 80 years ago, Waddington speculated that cancer is the response of cells that escape from the influence of a morphogenetic field.⁴³ The physical nature of this field remains enigmatic but the idea implies that in the absence of their normal environment cells by default will fall into the “cancer attractor” class and evolve into malignant tumors. On the other hand, differentiation states can be considered as attractors as well, suggesting that providing the right environmental cues, cells that escape from senescence might also redifferentiate and avoid tumorigenesis.

Table. Karyotype of cells that escape from senescence before or after growth in mice

Cells	Karyotype
IMR90+hTER-T+HRasV12+shERK Pre-injection	41~45, X,-X, del(3)(p2?5),add(4)(p1?6),add(6)(q2?5),-7,-8,-10,-13,add(14)(p11.2),add(14)(p11?3),16,add(21)(p11.2),add(22)(p11.2),1~3mar, inc[cp20]* 81~86, XXXX,-3,add(4)(p1?6)x2,-7,-13,-16,inc[3]**
Post-injection 1 (16 metaphases)	45,X
Post-injection 2 (1)	44, X-18
Post-injection 3 (2)	44,X-21
Post-injection 4 (1)	43,X -5,-18

*cp= composite karyotype, ** clone hypotetraploid, the mark indicates that the affected chromosome band is uncertain

References

- Bourdeau V, Ferbeyre G. Engaging a senescent response to cure leukemia. *Nat Med.* 2014;20(2):123-4.
- Deschênes-Simard X, Lessard F, Gaumont-Leclerc MF, Bardeesy N, Ferbeyre G. Cellular senescence and protein degradation: Breaking down cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 2014;13(12):1840-58.
- Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature.* 2005;436(7051):725-30.
- Toso A, Revandkar A, Di Mitri D, Guccini I, Proietti M, Sarti M, et al. Enhancing chemotherapy efficacy in Pten-deficient prostate tumors by activating the senescence-associated antitumor immunity. *Cell reports.* 2014;9(1):75-89.
- Guerra C, Collado M, Navas C, Schuhmacher AJ, Hernandez-Porras I, Canamero M, et al. Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell.* 2011;19(6):728-39.
- Caldwell ME, DeNicola GM, Martins CP, Jacobetz MA, Maitra A, Hruban RH, et al. Cellular features of senescence during the evolution of human and murine ductal pancreatic cancer. *Oncogene.* 2012;31(12):1599-608.
- Maldonado JL, Timmerman L, Fridlyand J, Bastian BC. Mechanisms of cell-cycle arrest in Spitz nevi with constitutive activation of the MAP-kinase pathway. *Am J Pathol.* 2004;164(5):1783-7.
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Mooi WJ, Peeper DS. BRAF(E600) in benign and malignant human tumours. *Oncogene.* 2008;27(7):877-95.
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature.* 2005;436(7051):720-4.
- Castro P, Giri D, Lamb D, Ittmann M. Cellular senescence in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Prostate.* 2003; 55(1):30-8.
- Deschênes-Simard X, Gaumont-Leclerc MF, Bourdeau V, Lessard F, Moiseeva O, Forest V, et al. Tumor suppressor activity of the ERK/ MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev.* 2013;27(8):900-15.
- Vernier M, Bourdeau V, Gaumont-Leclerc MF, Moiseeva O, Begin V, Saad F, et al. Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes Dev.* 2011;25(1):41-50.
- Romanov SR, Kozakiewicz BK, Holst CR, Stampfer MR, Haupt LM, Tlsty TD. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature.* 2001;409(6820):633-7.
- Deschênes-Simard X, Kottakis F, Meloche S, Ferbeyre G. ERKs in cancer: friends or foes? *Cancer Res.* 2014;74(2):412-9.
- Blazejczyk M, Miron M, Nadon R. FlexArray: A statistical data analysis software for gene expression microarrays. *Genome Quebec, Montreal, Canada.* 2007. <http://genomequebec.mcgill.ca/FlexArray>.
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44-57.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(43):15545-50.
- Gotea V, Ovcharenko I. DiRE: identifying distant regulatory elements of co-expressed genes. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Web Server issue):W133-9.
- Tchkonina T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* 2013;123(3):966-72.
- De Heller-Milev M, Huber M, Panizzon R, Hohl D. Expression of small proline rich proteins in neoplastic and inflammatory skin diseases. *The British journal of dermatology.* 2000;143(4):733-40.
- Deng Z, Matsuda K, Tanikawa C, Lin J, Furukawa Y, Hamamoto R, et al. Late Cornified Envelope Group I, a novel target of p53, regulates PRMT5 activity. *Neoplasia (New York, NY.)* 2014;16(8):656-64.
- Fridman AL, Tainsky MA. Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling. *Oncogene.* 2008;27(46):5975-87.
- Gaumont-Leclerc MF, Mukhopadhyay UK, Goumar S, Ferbeyre G. PEA-15 is inhibited by adenovirus E1A and plays a role in ERK nuclear export and Ras-induced senescence. *J Biol Chem.* 2004.
- Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature.* 2006;444(7119):633-7.
- Acosta JC, O'Loughlin A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell.* 2008;133(6):1006-18.
- Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature.* 2005;436(7051):642.

27. Chicas A, Wang X, Zhang C, McCurrach M, Zhao Z, Mert O, et al. Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer Cell*. 2010;17(4):376-87.
28. Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev*. 2009;23(7):798-803.
29. Passos JF, Saretzki G, Ahmed S, Nelson G, Richter T, Peters H, et al. Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol*. 2007;5(5):e110.
30. Moiseeva O, Bourdeau V, Roux A, Deschenes-Simard X, Ferbeyre G. Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Mol Cell Biol*. 2009;29(16):4495-507.
31. Blum R, Elkon R, Yaari S, Zundelovich A, Jacob-Hirsch J, Rechavi G, et al. Gene expression signature of human cancer cell lines treated with the ras inhibitor salirasib (S-farnesylthiosalicylic acid). *Cancer Res*. 2007;67(7):3320-8.
32. Font de Mora J, Porras A, Ahn N, Santos E. Mitogen-activated protein kinase activation is not necessary for, but antagonizes, 3T3-L1 adipocytic differentiation. *Mol Cell Biol*. 1997;17(10):6068-75.
33. Burton GR, Nagarajan R, Peterson CA, McGehee RE, Jr. Microarray analysis of differentiation-specific gene expression during 3T3-L1 adipogenesis. *Gene*. 2004;329:167-85.
34. Pujana MA, Han JD, Starita LM, Stevens KN, Tewari M, Ahn JS, et al. Network modeling links breast cancer susceptibility and centrosome dysfunction. *Nat Genet*. 2007;39(11):1338-49.
35. Sirchia SM, Ramoscelli L, Grati FR, Barbera F, Coradini D, Rossella F, et al. Loss of the inactive X chromosome and replication of the active X in BRCA1-defective and wild-type breast cancer cells. *Cancer Res*. 2005;65(6):2139-46.
36. Lopez-Bergami P, Huang C, Goydos JS, Yip D, Bar-Eli M, Herlyn M, et al. Rewired ERK-JNK signaling pathways in melanoma. *Cancer Cell*. 2007;11(5):447-60.
37. Leppa S, Saffrich R, Ansorge W, Bohmann D. Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *EMBO J*. 1998;17(15):4404-13.
38. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(10):749-58.
39. Moiseeva O, Deschenes-Simard X, St-Germain E, Igelmann S, Huot G, Cadar AE, et al. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF-kappaB activation. *Aging Cell*. 2013;12(3):489-98.
40. Juang YL, Jeng YM, Chen CL, Lien HC. PRRX2 as a novel TGF-beta-induced factor enhances invasion and migration in mammary epithelial cell and correlates with poor prognosis in breast cancer. *Mol Carcinog*. 2016.
41. Stepanenko AA, Andreieva SV, Korets KV, Mykytenko DO, Baklaushchev VP, Chekhonin VP, et al. mTOR inhibitor temsirolimus and MEK1/2 inhibitor U0126 promote chromosomal instability and cell type-dependent phenotype changes of glioblastoma cells. *Gene*. 2016;579(1):58-68.
42. Huang S, Ingber DE. A non-genetic basis for cancer progression and metastasis: self-organizing attractors in cell regulatory networks. *Breast Dis*. 2006;26:27-54.
43. Waddington CH. Cancer and the theory of organizers. *Nature*. 1935;135:606-8.

Recibido: 17 de enero de 2016.

Aprobado: 2 de abril de 2016.



Second International Convention IMMUNOPHARMACOLOGY - VACCIPHARMA 2017

IV International Congress on Immunopharmacology
(IMMUNOPHARMACOLOGY 2017)

IV International Congress on Pharmacology of Vaccines
(VACCIPHARMA 2017)

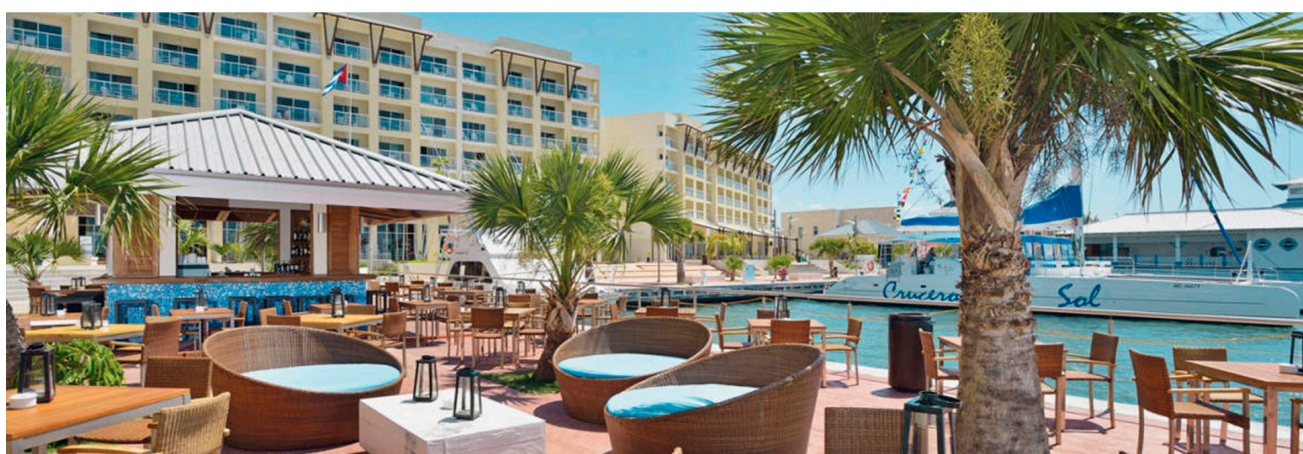


Cuban Society of Pharmacology
Meliá Marina Varadero Hotel, Varadero Beach, Cuba
June 25-29, 2017

Website: <http://www.immunovaccipharmacuba.com>



Second Announcement



Association of gliadin antibodies, HLA alleles, and schizophrenia in Cuban population patients

Asociación de anticuerpos antigliadina, alelos HLA y esquizofrenia en pacientes cubanos

José A. Galván¹, Hanlet Camacho², William W. Eaton³, Marcelo Nazabal², María E. Fernández de Cossio², Isabel Guillen², Seidy Pedroso², Raúl Mendoza⁴, Annia Ferrer², Juan Roca², Jesús Benitez², Lidia Inés Novoa².

DOI. 10.21931/RB/2016.01.02.4

ABSTRACT

Introduction: Several lines of evidence have suggested an interesting link between gluten ingestion and schizophrenia. For example, increased levels of gliadin and transglutaminase antibodies have been observed in patients with schizophrenia. **Methods:** To verify these observations we compared the prevalence of gliadin and transglutaminase antibodies, as well as the presence of the HLA alleles, HLA DQA1*0501-DQB1*02 (DQ2) and HLA-DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ8), among patients with schizophrenia and healthy controls. A total of 108 patients with schizophrenia and 60 healthy controls were evaluated. Gliadin antibodies were determined by a visual semiquantitative assay and tissue transglutaminase antibodies were determined both by one-step immunochromatographic assay and ELISA. HLA typing was performed by PCR amplification using sequence-specific primers for each allele. **Results:** We found a strong association between the presence of gliadin antibodies and schizophrenia (OR 3.488; 95% CI, 1.43-8.44). However, tissue transglutaminase antibodies were not detected in either group neither by immunochromatographic or ELISA. No significant association was found for the DQ2 or DQ8 heterodimer and the disease, but a significant positive association between schizophrenia and HLA alleles DQA1*0301 and DQB1*02 was present (OR = 2.80; 95% CI, 1.27-6.17, and OR = 2.37, 95% CI, 1.24-4.53, respectively). **Conclusions:** The present study showed that the presence of gliadin antibodies was not correlated with the presence of HLA DQA1*0301 or DQB1*02 alleles within the group of patients with schizophrenia. Our study replicates the findings that anti-gliadin antibodies are associated with schizophrenia but also suggests that the presence of these antibodies and the HLA alleles DQB1*02 and DQA1*0301 are independently associated with susceptibility to schizophrenia.

Keywords: Celiac disease, gliadin antibodies, tissue transglutaminase antibodies, HLA, schizophrenia, Cuba.

RESUMEN

Introducción: Varias evidencias han sugerido un interesante enlace entre la ingestión de gluten y la esquizofrenia. Un aumento de los niveles de anticuerpos antigliadina y transglutaminasa se ha observado en pacientes con esquizofrenia. **Métodos:** Se comparó la prevalencia de anticuerpos antigliadina y transglutaminasa, así como la presencia de los alelos HLA, HLA DQA1 * 0501-DQB1 * 02 (DQ2) y HLA-DQA1 * 0301-DQB1 * 0302 (DQ8), entre pacientes con esquizofrenia y controles sanos. Se evaluaron un total de 108 pacientes con esquizofrenia y 60 controles sanos. Los anticuerpos antigliadina se determinaron mediante un ensayo de anticuerpos transglutaminasa tisular y semicuantitativos visuales fueron determinados por el ensayo inmunocromatográfico de un solo paso y ELISA. La tipificación de HLA se realizó mediante amplificación por PCR utilizando cebadores específicos de secuencia para cada alelo. **Resultados:** Se encontró una fuerte asociación entre la presencia de anticuerpos de la gliadina y la esquizofrenia (OR 3,488; IC del 95%, 1,43-8,44). Sin embargo, los anticuerpos transglutaminasa tisular no se detectaron en ninguno de los grupos ni por inmunocromatografía o ELISA. No se encontró asociación significativa para el DQ2 o DQ8 heterodímero y la enfermedad, sino una asociación positiva significativa entre la esquizofrenia y los alelos HLA DQA1 * 0301 y DQB1 * 02 estaba presente (OR = 2,80; IC del 95%, 01/27 a 06/17, y OR = CI 2,37, 95%, 1,24 a 4,53, respectivamente). **Conclusiones:** Se demostró que la presencia de anticuerpos de gliadina no se correlacionó con la presencia de HLA DQA1 * 0301 o DQB1 * 02 alelos dentro del grupo de pacientes con esquizofrenia. Nuestro estudio replica los hallazgos de que los anticuerpos anti gliadina están asociados con la esquizofrenia, pero también sugiere que la presencia de estos anticuerpos y la HLA alelos DQB1 * 02 y DQA1 * 0301 están asociados independientemente con la susceptibilidad a la esquizofrenia.

Palabras clave: Enfermedad celíaca, anticuerpos anti gliadina, anticuerpos transglutaminasa tisular, HLA, esquizofrenia, Cuba.

Introduction

Celiac disease (CD) is one of the most common severe food intolerances in the Western world affecting, almost 1% of the population. The disease is an autoimmune reaction triggered by gluten ingestion in genetically susceptible children and adults. The conclu-

sive diagnosis of CD is carried out by intestinal biopsy, which provides evidence of the histological changes characteristic of this disease. However, serological screening methods, such as those detecting gliadin antibodies (AGA) and anti-tissue transglutaminase antibodies (tTGA), have gained attention because they are cheaper and less invasive.¹

¹ Department of Immunology, Institute of Hematology and Immunology, Havana, Cuba.

² Immunodiagnosics and Genomics Division, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Havana, Cuba.

³ Department of Mental Health, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Maryland, USA

⁴ Neuroscience Center, Havana, Cuba.

Correspondence: José Armando Galván Cabrera, MD, PhD. Institute of Hematology and Immunology. Ave 100 y Perla, Altahabana, Boyeros, Havana, Cuba. CP 10800. Tel (537) 6438268, 6438695. Fax: (537) 6442334. E-mail: jagalvancabrera@gmail.com
jagalvan@infomed.sld.cu

CD and Gluten Sensitivity, a reaction of the innate immune system to wheat peptides, have been associated with neurologic and psychiatric disorders including cerebellar ataxia, peripheral neuropathy, epilepsy, dementia, depression and autism.² Given that the prevalence of schizophrenia is almost 1%, the concurrence between schizophrenia and celiac disease would be expected to be rare; however a possible association between gluten and schizophrenia has been suggested in reports of sporadic cases, and comparisons between samples of persons with schizophrenia and healthy comparison groups.^{3, 4} But another previous study based on the screening for specific CD antibodies among patients with schizophrenia suggested that there is no direct association between celiac disease and schizophrenia.⁵ In addition, some studies reported that psychotic symptoms occur in adult celiac disease, and schizophrenic symptoms can improve after gluten-free diet.⁶

A recent study hypothesized that gene-associated susceptibility and environment interaction could importantly contribute to schizophrenia. According to this hypothesis, gut disorders such as CD can lead to poor nutritional conditions and alteration in gut permeability; in this scenario, the gut could lose its capacity to block exogenous psychosis-causing substances that may enter the body promoting the development of schizophrenia and other mental conditions.⁷ In fact, CD and schizophrenia are complex disorders that have been reported to share genetic relationships. Susceptibility to CD is genetically determined by possession of specific HLA-DQ2 (DQA1*0501, DQB1*0201) and DQ8 (DQA1*0301, DQB1*0302) alleles located on chromosome 6, in concert with one or more non-HLA linked genes.⁸ The DQB1 locus has been associated with both celiac disease and schizophrenia.⁹

Genetic linkage studies for non-HLA loci in CD and schizophrenia suggest several areas of overlap. Recent studies have also shown susceptibility regions for CD in chromosome 11q23 that overlap with a potential schizophrenia susceptibility region.¹⁰ Another study has suggested that gene MYO9B on chromosome 19, which encodes a myosin molecule involved in actin remodeling of epithelial enterocytes, might be associated with an increased risk of developing celiac disease and schizophrenia.¹¹ However, a more recent study found no evidence for association between schizophrenia and Non-HLA CD genes, and suggests that these two conditions do not share any functional overlap.¹²

The objective of the present study was to compare the prevalence of gliadin antibodies, antitransglutaminase antibodies, and HLA DQA1*0501-DQB1*02 (DQ2) and HLA-DQA1*0301-DQB1*0302 alleles (DQ8) between Cuban patients with schizophrenia and healthy controls.

Methods

Subjects: The study was carried out to determine the presence of AGA and a tTGA in 108 outpatients with paranoid subtype schizophrenia, recruited at the Neuroscience Center in Havana, Cuba. Patients were evaluated by trained psychiatrists using the Spanish version of the Schedules for Clinical Assessment in Neuropsychiatry, and were diagnosed with paranoid schizophrenia according to the fourth edition of the American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders criteria (DSM-IV).^{13, 14} There were 72 males and 36 females with average age of 35.44 years. The control group comprised 60 mentally normal volunteers, 31 females and 29 males, 37.61 years-old in average, who had never taken psychotropic drugs or presented any psychiatric disorder as determined by their reported history during the clinical interview and by structured diagnostic criteria categorized according to DSM-IV criteria. No individual reported to have any first-degree relatives with schizophrenia or psychosis. Individuals from both groups completed a questionnaire exploring sign and symptoms of celiac disease,

and registering sociodemographic, nutritional and health habits items. This research was approved by the Ethics Research Committees of all institutions involved. Patients and controls had given written informed consent for participation in the study. All subjects included in the study agreed with the terms of the informed consent before the sample was selected.

Anti-gliadin antibodies detection: AGA were measured by AuBioDOT™ gliadin (HerberBiotec S.A, La Habana, Cuba) as described in detail elsewhere.¹⁵ Briefly, AuBioDOT™ gliadin is a semiquantitative visual immunoassay based on 8 well opaque-white polystyrene strips coated with wheat gliadin (Sigma, USA). After incubation with a serum or plasma sample, AGA was detected with a protein A-gold conjugate probe. Silver ion solution is used to enhance the reaction, and PBS-Tween washings are included after each step. The intensity of the color is proportional to the quantity of AGA in the samples. A highly positive control serum and a cutoff standard are used to categorize samples as negatives or positives.

Anti-transglutaminase antibodies detection: The tTGA were detected in blood by using a fast one-step immunochromatographic assay (HeberFast Line® anti-transglutaminase, Heber Biotec S.A, Havana, Cuba) that has been shown to have high sensitivity and specificity for diagnosis of the disease. Details of this assay have been described elsewhere.¹⁶ HeberFast Line® anti-transglutaminase is a qualitative assay and consists of a nitrocellulose strip inserted in a plastic cassette, which is filled with blood obtained from a finger puncture. After 20 minutes, a positive result consists in signals in both the reactive zone and the control zone. A signal only in the control zone represents a negative result. The HeberFast Line® anti-transglutaminase assay detects both IgA and IgG antibodies responses, but cannot distinguish between them. Additionally, IgA anti-transglutaminase antibodies were determined in serum by ELISA (Celikey Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Germany) using cut-offs values as recommended by the manufacturer.

DNA Isolation and HLA Typing: DNA was isolated from whole blood using a Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) according to the manufacturer's instructions. Selected HLA alleles DQ2 (HLA-DQA1*0501-DQB1*02) and DQ8 (HLA-DQA1*3-DQB1*0302) genotyping, was performed by PCR amplification, using sequence-specific primers (PCR-SSP), as previously described.¹⁷ Primers were obtained from the Department of Oligonucleotide Synthesis at the Center of Genetic Engineering and Biotechnology (Havana, Cuba) and used at 0.25 µmol/L. Amplified products were analyzed in 3% agarose gels and visualized under a UV transilluminator after ethidium bromide staining.

Definition of Celiac Disease: CD was defined by a combination of tTGA and HLA DQ2 or DQ8 positives, as first-line diagnostic criteria, considering the high negative predictive value of the tTGA and HLA markers for celiac disease. We also considered the presence of CD-associated symptoms and AGA to complement the first-line diagnostic criteria.

Statistical Analysis: The Fisher exact test was used to compare HLA allele frequencies between patients and controls. A precise correction method for multiple comparisons was applied using the formula $\alpha=1-(0.951/N)$, where N is the number of comparisons one or more of which shows a significant result.¹⁸ The χ^2 test with Yates' correction was used to compare the positivity for gliadin antibodies in patients and controls in 2 x 2 tables. Odds ratios with 95% confidence intervals were also estimated. Statistical significance was considered for p values <0.05 for gliadin antibodies comparisons, and p values <0.017 for HLA alleles associations. All the analysis was made using the SPSS software version 15. In order to determine the correlation between the presence of gliadin antibodies and specific HLA DQ alleles in the group of patients with schizophrenia, the correlation coefficient Phi (ϕ) was calculated using the Pearson correlation with Yates'

correction for continuity implemented in SPSS software version 15. For multiple tests we applied Bonferroni corrections.

Results

Celiac Disease Symptoms: No symptoms of celiac disease were detected on the basis of the criteria established in the questionnaire. There were also no symptoms found for other disorders associated with so-called "silent" celiac disease.

Serological Test: Gliadin antibodies were detected in 34 (31.48%) patients with schizophrenia compared with only in 7 (11.66%) individuals in the control group ($p < 0.05$). We found a strong association between high levels of gliadin antibodies and schizophrenia, $OR = 3.478$ (95% CI, 1.433- 8.443) (Table 1), suggesting that the presence of these antibodies could increase the probability of having schizophrenia more than three times (Table

Table 1. Association of gliadin antibodies (AGA) in patients with schizophrenia and controls

AGA	Patients N=108	Controls N=60	Odds Ratio (95% CI)	χ^2 test P value
positive	34 (31.48%)	7 (11.66%)	3.479 (1.433- 8.443)	0.0041*
negative	74 (68.52%)	53 (88.34%)		

* P value < 0.05

1). However, no serum sample from patients or controls was positive for tTGA, as determined both by enzyme-linked immunosorbent assay and by immunochromatographic.

HLA Typing: In this study, DQ2 or DQ8 heterodimers were not associated with schizophrenia. Nonetheless, single alleles DQA1*0301 and DQB1*020 were positively associated with schizophrenia, indicating that their presence confers disease susceptibility ($OR = 2.803$, 95% CI: 1.273-6.172; and $OR = 2.368$, 95% CI: 1.237-4.534, respectively). In contrast, association of the HLA allele DQB1*0301 with schizophrenia ($p < 0.05$; $OR = 2.357$, 95% CI: 1.064-5.221) was not significant after Bonferroni correction. It is important to emphasize that although the correction for multiple independent comparisons is particularly recommended when more than five significant associations are found, we preferred to be more conservative and applied it in this case even for three statistically significant associations (Table 2).

Correlation analysis of anti-gliadin antibodies with HLA DQ chains: In order to determine if the observed association between schizophrenia and HLA alleles was not the result of a

confounding bias, due to the relationship of these HLA alleles and celiac disease (or associated markers), we test the correlation between gliadin antibodies and HLA DQ alleles within the group of patients with schizophrenia. In this study sample, the presence of gliadin antibodies was not correlated with any of the HLA DQ alleles as shown in Table III; phi (ϕ) values are close to zero and

Table 3. Analysis of correlation between gliadin antibodies and the HLA DQ chains in schizophrenic patients, phi (ϕ) correlation coefficient for the 2x2 table of DQ2a, DQ2b, DQ8a and DQ8b alleles with gliadin antibodies applying the Pearson correlation coefficient with Yates correction

HLA allele	Phi (ϕ)	Pearson Chi square	P value
DQA1*0501	+0.1	0.59	0.442419
DQB1*02	-0.03	0.99	1
DQA1*0301	-0.06	0.2	0.654721
DQB1*0302	0.24	4.97	0.025791*

* P value < 0.05

none of the X^2 tests were statistically significant after correction for multiple tests. Only the HLA DQB1*0301 allele showed weak to modest correlation ($\phi = 0.24$, $p < 0.05$) (Table 3).

Discussion

Schizophrenia and celiac disease each affect almost 1% of general population worldwide. A similar epidemiological characteristic have been reported for the Cuban population.¹⁹ A high prevalence of comorbidity between the two conditions would be unexpected by chance. However, some epidemiological studies⁴ and sporadic case reports³ suggest a possible association. Some studies reported that psychotic symptoms often occur in adult celiac disease and schizophrenic symptoms can improve after gluten-free diet.⁶

In our study we did not find celiac disease in patients with schizophrenia. But we found a strong association between high AGA level and schizophrenia in patients as compared with controls (Table 1). The higher prevalence of AGA in patients with schizophrenia suggests that Gluten Sensitivity confers susceptibility to schizophrenia. It is important to note that in this setting, gliadin antibody prevalence among individuals of the control group was similar to that reported for larger population studies: 2–12%.²⁰

Antibodies to tTG and the HLA markers for CD have high negative predictive value for CD. Since antibodies to tTG were not found in both groups, and, as well, the fact that there were no significant differences in the presence of susceptibility genes

Table 2. Association of HLA alleles DQA1*0501, DQB1*02 and DQA1*0301, DQB1*0302 and the DQ2 and DQ8 heterodimers in patients with schizophrenia and controls

HLA	Patients N=104	Controls N=60	Odds Ratios (95% CI)	Fisher exact P value
DQA1*0501	42 (40.38%)	31 (51.66%)	0.634 (0.334-1.202)	0.108
DQB1*02	67 (64.42%)	26 (43.33%)	2.368 (1.237-4.534)	0.007*, **
DQA1*0301	37 (35.57%)	10 (16.66%)	2.803 (1.273-6.172)	0.006*, **
DQB1*0302	33 (31.73%)	10 (16.66%)	2.357 (1.064-5.221)	0.0230*
DQ2+	19 (18.26%)	13 (21.66%)	0.808 (0.367-1.781)	0.369
DQ8+	13 (12.5%)	10 (16.66%)	0.714 (0.292-1.746)	0.302

* P value < 0.05

** P value corrected after bonferroni $P < 0.017$ ($\alpha = 1 - 0.95^{1/N}$)

for celiac disease in schizophrenia and control subjects, our study suggests that these patients do not have CD. Therefore, these data suggest a potential connection between gluten and schizophrenia. This is in agreement with others' results, particularly with a recently published study that also found that most patients with schizophrenia and elevated AGA titers do not have tTGA and do not appear to have celiac disease.^{5,21} Besides, these authors argue that sample size in their study was not large enough to exclude the possibility of celiac-associated-markers (HLA-DQ2/DQ8 genes, tTGA, anti-deamidated gliadin antibodies), and thereby celiac disease, being more prevalent in patients with schizophrenia than in normal healthy individuals. However, our study has more than six times the sample size of the previously mentioned one but we found the same results. In another study Cascella et al. reported an increased prevalence of celiac disease in patients with schizophrenia: 5.4% versus 0.80% in the control group, based on the presence of tTGA. But curiously they found no differences in the presence of anti-endomysial antibody between two groups in the same study.⁵ This last finding seems contradictory since antibodies to endomysial tissue are highly sensitive and specific; many studies have reported values in the range of 95-100% for both of these parameters.²²

We found an association between schizophrenia and the presence of alleles DQB1*02 and DQA1*0301, which is in line with previous reports.²³ Wei and Hemmings⁷ hypothesized that combinations of some DQB1 alleles and defects of the gene CLDN5, which forms permeability barriers in the gut and in the blood-brain barrier may confer a susceptibility to schizophrenia. Our data do not support this hypothesis at least in the context of a similar relationship between anti-gliadin immune response and the proposed gene-defect in gut barrier function, in the framework of coexistence of particular HLA DQ alleles. In our data the presence of high levels of AGA in the serum of patients was independent of the presence of the alleles DQB1*02 and DQA1*0301. Although high levels of anti-gliadin antibodies were correlated with the allele DQB1*0301, this allele is not associated with schizophrenia. These data reinforce our view that the relationship of schizophrenia with high levels of AGA, and these specific DQ alleles associations with schizophrenia are independent.

Gluten is linked to neurological harm in patients, both with and without evidence of celiac disease.^{3,12} The neurotoxic potential of AGA is a contentious issue. Some authors report an increase of AGA levels in neurological diseases. Pellecchia et al.²⁴ reported the occurrence of high AGA levels in 18.7% of multiple system atrophy affected-patients and Bushara et al.²⁵ reported 37% and 44% AGA prevalence in patients with hereditary ataxia and Huntington's disease respectively.

The neurotoxicity of Gliadin antibodies could be conditioned by their capacity to gain access to the central nervous system.⁶ As a matter of fact, AGA has been found in the cerebrospinal fluid in patients with gluten sensitivity and neurological dysfunction. Furthermore, in patients with gluten ataxia, the occurrence of lymphocytic infiltration of the perivascular space and the neutrophil by CD4 and CD8 T cells has been observed, suggesting the presence of a cell-mediated response, which in turn may compromise blood-brain barrier and allow the access of AGA into the central nervous system.⁶ On the other hand, AGA levels may be only a reflection of increased intestinal permeability. If this function of the gut is altered, some of the environmental factors, for example, potentially pathogenic components from ingested foods could easily enter the blood stream through the damaged permeability barrier. Consequently, a disease affecting the brain could be triggered.²⁶ In this context, it could be of interest to evaluate gluten peptide presence in cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia.

Some authors suggest that there is an increased permeability of the gut irrespective of the genetic predisposition to autoimmunity. The passage of gliadin through the gut barrier could be mediated by receptors. In a recent study, Lammers et al. identified the chemokine receptor CXCR3 as a receptor for gliadin. Their data suggest that gliadin binds CXCR3 on epithelial cells and triggers the increase in intestinal permeability through MyD88-dependent release of zonulin. This protein enables paracellular passage of gliadin (and possibly other nonself antigens) from the intestinal lumen to the gut mucosa.²⁷

Conclusions

Our results reveal an association between AGA and schizophrenia. Further studies are needed to elucidate the clinical consequences of this finding, to clarify mechanisms underlying potential pathophysiological relationships among gliadin, AGA and schizophrenia, and to investigate the potential of gluten-free diet as an environmental modifier of the disease.

References

1. Fasano A, Araya M, Bhatnagar S, Cameron D, Catassi C, Dirks M, et al. Celiac Disease Working Group. Federation of International Societies of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Consensus report on celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 47: 214-9. doi: 10.1097/MPG.0b013e318181afed.
2. Jackson JR, Eaton WW, Cascella NG, Fasano A, Kelly DL. Neurologic and Psychiatric Manifestations of Celiac Disease and Gluten Sensitivity. *Psychiatr Q*; 2012; 83: 91-102. doi: 10.1007/s11266-011-9186-y.
3. Brown JS Jr. Celiac disease and schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2012; Sep; 169(9):991-2. doi: 10.1176/appi.ajp.2012.12060735.
4. Okusaga O, Yolken RH, Langenberg P, Sleemi A, Kelly DL, Vaswani D, et al. Elevated gliadin antibody levels in individuals with schizophrenia, *World Journal of Biological Psychiatry*. 2013; 14(7):509-15. doi: 10.3109/15622975.2012.747699.
5. Peleg R, Ben-Zion ZI, Peleg A, Gheber L, Kotler M, Weizman Z, et al. "Bread madness" revisited: screening for specific celiac antibodies among schizophrenia patients. *Eur Psychiatry*. 2004; 19:311-4.
6. Hadjivassiliou M, Sanders DS, Grünewald RA, Woodroffe N, Boscolo S, Aeschlimann D. Gluten sensitivity: from gut to brain. *Lancet Neurol*. 2010; 9: 318-30. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70290-X.
7. Wei J, Hemmings GP. Gene, gut and schizophrenia: the meeting point for the gene-environment interaction in developing schizophrenia. *Med Hypotheses* 2005; 64:547-52.
8. Dieterich W, Esslinger B, Schuppan D. Pathomechanisms in celiac disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 132:98-108.
9. Schwab SG, Hallmayer J, Lerer B, Albus M, Borrmann-Hassenbach M, et al. Investigation of linkage and association/linkage disequilibrium of HLA A-, DQA1, DQB1-, and DQB1-alleles in 69 sib-pair- and 89 trio families with schizophrenia. *Am J Med Genet* 2002; 114:315-20.
10. Debono R, Topless R, Markie D, Black MA, Merriman TR. Analysis of the DISC1 translocation partner (11q14.3) in genetic risk of schizophrenia. *Genes Brain Behav*. 2012 Oct; 11(7):859-63. doi: 10.1111/j.1601-183X.2012.00832.x.
11. Jungerius BJ, Bakker SC, Monsuur AJ, Sinke RJ, Kahn RS, Wijmenga C. Is MYO9B the missing link between schizophrenia and celiac disease? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008; 174:351-355.
12. Law MH, Bradford M, McNamara N, Gajda A, Wei J. No Association Observed between Schizophrenia and Non-HLA Coeliac Disease Genes: Integration With the Initial MYO9B Association With Coeliac Disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2011; 156B:709-19. doi: 10.1002/ajmg.b.31213.
13. Vázquez-Barquero JL, Gaité L, Artal Simón J, Arenal A, Herrera Castanedo S, Díez Manrique JF, et al. Development and verification of the Spanish version of the "scanning system" psychiatric interview ("Questionnaires for clinical evaluation in neuropsychiatry"). *Actas Luso Esp Neurol Psiquiatr Cienc Afines* 1994; 22:109-20.

14. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 1994. 4th edition. Washington DC, American Psychiatric Press.
15. Garrote JA, Sorell L, Alfonso P, Acevedo B, Ortigosa L, Ribes-Koninckx C, et al. A novel visual immunoassay for coeliac disease screening. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 697-699.
16. Galván JA, Acevedo B, Novoa LI, Rubi JA, Torres E, Leal V, et al. Development, validation and registration of the HeberFast Line® anti-transglutaminase system. Contribution to the diagnosis of Celiac Disease in Cuba. *BiotechnolApl* 2008; 25: 66-9.
17. Olerup O, Aldener A, Fogdell A. HLA-DQB1 and DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in two tours. *Tissue Antigens* 1993; 41:119-34.
18. Sham P. Statistics in Human Genetics. Arnold Applications of Statistics, New York, 1998. Strachan, T. & Read, A. Human Molecular Genetics. 3rd ed.
19. Galván JA, Lemos G, Fernández de Cossio ME, Ruenes C, Martínez Y, et al. Silent celiac disease in a cohort of healthy adults. *Autoimmunity* 2009; 42: 705-8. doi: 10.3109/08916930903214009.
20. Freeman HJ. Neurological disorders in adult celiac disease. *Can J Gastroenterol*. 2008 Nov; 22(11):909-11.
21. Samaroo D, Dickerson F, Kasarda DD, Green PH, Briani C, Yolken RH, et al. Novel immune response to gluten in individuals with schizophrenia. *Schizophr Res* 2010; 118:248-55. doi: 10.1016/j.schres.2009.08.009.
22. Rostom A, Murray JA, Kagnoff, MF. American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology* 2006; 131:1981-2002.
23. Gutierrez-Achury J, Zhernakova A, Pulit SL, Trynka G, Hunt KA, Romanos J, Raychaudhuri S, van Heel DA, Wijmenga C, de Bakker PI. Fine mapping in the MHC region accounts for 18% additional genetic risk for celiac disease. *Nat Genet*. 2015 Jun;47(6):577-8. doi: 10.1038/ng.3268.
24. Pellecchia MT, Ambrosio G, Salvatore E, Vitale C. Possible gluten sensitivity in multiple system atrophy. *Neurology* 2002; 59:1114-5.
25. Bushara KO, Nance M, Gomez CM. Gliadin antibodies in Huntington disease. *Neurology* 2004; 6:132-3.
26. Fanciulli G, Dettori A, Demontis MP, Tomasi PA, Anania V, Delitala G. Gluten exorphin B5 stimulates prolactin secretion through opioid receptors located outside the blood-brain barrier. *Life Sci* 2005; 76:1713-19.
27. Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, Ralabhandi P. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology* 2008 135:194-204. doi: 10.1053/j.gastro.2008.03.023.

Recibido: 16 de enero de 2016.

Aprobado: 8 de marzo de 2016.

Biología para la producción y la vida



Técnicas Agrícolas | Cultivo de Tejidos | Bioproductos
Fitopatología/Microbiología | Biología Molecular | Biorremediación



www.cibe.espol.edu.ec | @CIBE_ESPOL | @cibe.espol

INVESTIGACIÓN / RESEARCH

Comparison of two methods with potential application in the detection of viremia produced by clinical dengue virus isolates

Comparación de dos métodos con aplicación potencial en la detección de viremia a partir de aislamientos clínicos de virus dengue

Jorge Martín*, Laura Lazo, Iris Valdés, Lázaro Gil, Yaremis Romero, Jorge Castro, Gerardo Guillén, Lisset Hermida

DOI. 10.21931/RB/2016.01.02.5

ABSTRACT

Most clinical isolates do not form clear plaques on cell monolayers. Therefore, they can not be detected by plaque assay. Reliable alternative methods for the measurement of viremia are thus required for the validation of the protective efficacy of dengue vaccine candidates against circulating virus strains. In this work, two different cell culture formats (25 cm² flasks and 24-well plates) were used to isolate dengue virus from 48 serum samples collected from monkeys. Only 8 dengue positive sera were detected after isolation in 24-well plates. In contrast, the 25 cm²-flask format allowed the detection of virus in 22 serum samples, suggesting that the Vero cell monolayer area influences virus isolation. We also compared the sensitivity of ELISA and flow cytometry for detecting dengue virus after isolation in Vero cell culture. Both techniques showed 100% specificity and similar sensitivity. In addition, there was a high agreement rate and correlation between the two techniques. Our findings suggest that ELISA and flow cytometry have similar capacity to detect and quantify dengue virus from monkey serum samples after virus isolation in cell culture.

Keywords: dengue, viremia, ELISA, flow cytometry.

RESUMEN

La mayoría de los aislamientos clínicos no forman placas distinguibles en las monocapas celulares, por lo que no pueden ser detectados con el método de formación de placas. Por tanto, se requieren métodos de medición de viremia alternativos y confiables para la evaluación de la capacidad protectora de candidatos vacunales contra el dengue frente a las cepas virales circulantes. En este trabajo se utilizaron dos formatos para el aislamiento de virus dengue a partir de 48 muestras de suero de mono: placas de 24 pozos y frascos de 25 cm². Solo 8 sueros se detectaron como positivos tras el aislamiento en placas de 24 pozos, mientras que en frascos de 25 cm² se detectaron 22 sueros positivos, lo que sugiere que el área de la monocapa celular influye en los resultados de la detección. Además, se comparó la sensibilidad del ELISA y la citometría de flujo para la detección de virus dengue tras el aislamiento en células Vero. Ambas técnicas mostraron 100% de especificidad y similar sensibilidad, además de una elevada concordancia y correlación entre los resultados de detección obtenidos con ellas. Los resultados de este trabajo sugieren que el ELISA y la citometría de flujo tienen similar capacidad para la detección y cuantificación de virus dengue a partir de sueros de monos tras el aislamiento en cultivo celular.

Palabras clave: dengue, viremia, ELISA, citometría de flujo.

Introduction

Dengue is a single-stranded positive-sense RNA virus that belongs to the *Flavivirus* genus in the *Flaviviridae* family. There are four serotypes of antigenically related dengue viruses, and infection with any of them can produce a spectrum of diseases that range from asymptomatic or mild febrile illness to the more severe dengue hemorrhagic fever and/or dengue shock syndrome¹.

Dengue is currently a major global health problem. It is estimated that 390 million DV infections occur annually in the world, of which 96 million are apparent². This pathogen is endemic in over 100 coun-

tries from the tropical and subtropical regions where 2.5–3.6 billion people are at risk for infection. Although many efforts have been made, there is no effective vaccine to prevent this disease. The absence of an animal model that reproduces the signs observed in humans is one of the major pitfalls. So far, primates are considered the most appropriate animal model and the effectiveness of a vaccine candidate is only assessed by the lack of viremia in vaccinated monkeys³. Therefore, reliable measurements of viremia are of great importance in the process of validating any vaccine.

The plaque assay, based on the formation of viral plaques on cell culture, is the “gold-standard” method

Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB). Havana, Cuba.

*Correspondence: Jorge Martín Machado. Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB).

Ave 31, P.O. Box 6162, Havana 6, 10 600, Cuba

Fax (53-7) 271 4764, Phone: (53-7) 271 6022. E mail: jorge.martin@cigb.edu.cu

for the detection and titration of dengue virus⁴. However, some dengue virus strains, especially among primary clinical isolates, do not form clear plaques on cell monolayers⁵⁻⁷. On the other hand, the use of these isolates in challenge experiments with non-human primates may be of particular importance to clearly determine the protective capacity of vaccine candidates against circulating dengue virus strains in endemic areas.

In this work we compared two different cell culture formats to isolate virus from non-human primate serum samples using Vero cells. We also performed a preliminary comparison of two dengue virus detection methods as potential alternatives to the plaque assay for the detection and titration of viral strains that do not produce plaques on cell monolayers. Accordingly, we evaluated the sensitivity and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and flow cytometry (FC) for virus detection from infected Vero cells, and determined the correlation of viremia quantification between these two techniques.

Methods

Cell lines, virus strains and serum samples

African green monkey kidney (Vero) cells were obtained from the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC accession number: 011038) and maintained in RPMI 1640 medium (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) supplemented with 100 U ml⁻¹ penicillin, 100 µgml⁻¹ streptomycin (Gibco, Paisley, UK), 2mM glutamine (Gibco) and 5% fetal bovine serum. Baby hamster kidney (BHK-21) cells, clone 15, were obtained from the cell culture department of the Tropical Medicine Institute, Cuba, and grown under standard conditions (minimal essential medium supplemented with 5% FBS, 100 U ml⁻¹ penicillin, 100 µgml⁻¹ streptomycin (Gibco, Paisley, UK)). Dengue-2 virus (strain SB8553) was used as positive control in ELISA, plaque formation and flow cytometry. Serum samples were obtained from 16 infected green monkeys (*Chlorocebus aethiops sabaeus*) during the first 10 days after infection with dengue-2 virus (SB8553), including the day of challenge.

Virus isolation

Sera were inoculated onto Vero cell monolayers either in 25 cm² flasks (Costar, Cambridge, MA, USA) or in 24-well plates (Costar, Cambridge, MA, USA). A volume of 0.15 mL of serum was added to each well of flask. After one hour of incubation at 37°C, 3 mL and 1 mL of RPMI medium was added without rinsing to the 25 cm² flasks and the 24-well plates respectively, and cultures were incubated for 6 days. Then infected cells and culture supernatants were harvested separately and assayed for the presence of virus.

ELISA

Ninety-six-well flat-bottom plates (Costar, Cambridge, MA, USA) were coated with 0.1 mL/well of a mixture of anti-dengue human (IgG) (5 µg/mL) in coating buffer (0.16% Na₂CO₃, 0.29% NaHCO₃, pH 9.5) for 2 h at 37°C. Then plates were blocked with 0.15 mL/well of 5% skimmed milk and incubated for another 1 h at 37°C. After two washes with phosphate-buffered saline-Tween 0.05% (PBS-T), 0.1 mL of culture supernatant was added in triplicate to each well and plates were incubated for 2 h at 4°C. Three additional washes were performed and then 0.1 mL/well of polyclonal hyperimmune mouse ascitic fluid, diluted 1:2 000 in PBS-T was added to the plates. After 1 h of incubation at 37°C, plates were washed again three times and then 0.1 mL/well of goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) was added at a dilution of 1:35 000 in PBS-T. Plates were

incubated 1 h at 37°C, washed three times, and substrate solution was added. The reaction was stopped 30 min later by addition of 12.5% H₂SO₄ and the optical density was measured at 492 nm (OD_{492nm}) using an automated ELISA reader. A value of OD of two-fold the OD of the supernatant from an uninfected culture was considered as positive.

Plaque formation in BHK-21 cell cultures

Virus replication was determined by plaque formation in BHK-21 cells, according to the method of Morens *et al* 8. Briefly, Costar 24-well plates were inoculated with culture supernatant and incubated 4 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Later, 0.5 mL of 3% medium-viscosity carboxymethylcellulose was added. Plates were incubated at 37°C during 5 days in a 5% CO₂ atmosphere. To visualize the viral plaques the monolayer was dyed with naphthol blue black solution (0.1% naphthol blue black, 0.2 M sodium acetate, 6% acetic acid).

Detection of infected cells by flow cytometry

Vero cells were removed from the flask using a cell scraper and distributed into triplicate tubes at 10⁶ cells per tube. The cells were fixed using 200 µl of 3% formaldehyde in phosphate-buffered saline (pH 7.2) (PBS) for 15 min and 200 µl of 0.1% Triton X-100 was employed to permeabilize fixed cells. After washing with PBS, the cells were incubated with the monoclonal antibody 4G2 for 30 min at 4°C. Then cells were washed and incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-mouse IgG for 30 min at 4°C. After incubation cells were washed again, suspended in PBS and then analyzed using a FACScan flow cytometer PASIII (Partec GmbH, Münster, Germany). Non-infected cells were used as negative control and cells infected with dengue-2 virus (strain SB8553) at 0.001 multiplicity of infection, were used as positive control. A value of three fold the value of non-infected cells was considered as positive.

Statistical analysis

The comparison between results on detection of virus by different techniques is reported in terms of agreement rates, sensitivity and specificity. The agreement rate is defined as the ratio between the number of samples equally detected (either positive or negative) by both techniques and the total number of samples analyzed. The sensitivity is the ratio of sera detected as positive by a technique with respect to the gold standard technique. The specificity is a measure of the rate of negatives that are correctly identified.

Two approaches were used for a quantitative comparison of viremia levels measured by ELISA and flow cytometry: a) the correlation between OD 492nm and percentage of infected cells, assessed by the Pearson's correlation coefficient and b) the linear regression test. Both analyses were carried out with the GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results and Discussion

Comparison of two cell culture formats for virus isolation in Vero cells

Four methods of virus isolation have been routinely used for dengue viruses: intracerebral inoculation of newborn mice, intrathoracic inoculation of adult mosquitoes, inoculation of mosquito cell cultures and inoculation of mammalian cell cultures.⁹ Specifically for sera collected from monkeys, the most commonly used system is the mammalian cell culture. However, it is unclear how the number of cells in the monolayer influences the results.

Generally, 25 cm² flasks have been the preferred format¹⁰⁻¹² although 24-well plates could offer the advantages of handling a higher number of samples and cost reduction.

We performed a virus isolation experiment using both cell culture formats and 48 serum samples from green monkeys. Samples were collected during the first 10 days after dengue virus infection, including the day of challenge, with the aim of having samples with expected low and high viral loads. The virus isolated was detected by plaque formation (PF) in BHK-21 cells (Table 1).

Table 1. Results of virus detection by plaque formation in BHK-21 cells after isolation in Vero cells using two cell culture formats: 25 cm² flasks and 24-well plates

Virus detection	No. of samples evaluated (%) ^a	
	25 cm ² flasks	24-well plates
Positive	22 (45.8%)	8 (16.7%)
Negative	26 (54.2%)	40 (83.3%)
Total	48	48

^a Percentages are related to the 48 assays in each format

Surprisingly, only 8 (16.7%) sera were detected as positive after isolation using 24-well plates. In contrast, the use of 25 cm² flasks led to the detection of 22 (45.8%) positive sera after isolation, including the samples detected with the 24-well format. This result points to the importance of the cell monolayer area in the isolation system for the subsequent viral detection. Therefore, a thorough study on the optimal area of the cell monolayer should be carried out in the future, looking for a balance between higher sensitivity, maneuverability and cost.

Comparison of ELISA and flow cytometry for dengue virus detection and quantification

We also compared the sensitivity and specificity of ELISA and flow cytometry for the detection of dengue virus in a set of 187 serum samples collected from monkeys. Based on the results of the previous section, virus isolation was performed using Vero cell culture in 25 cm² flasks. The cells from each flask were harvested for FC analysis while the culture supernatant was collected for evaluation by ELISA and plaque formation in BHK-21 cells. The plaque formation assay was used as a control.

Table 2 shows the number of sera detected as positive or negative by ELISA and FC. Both techniques showed 100% specificity, with no false positive detections, and similar sensitivity (84.2% for ELISA versus 78.9% for FC). In general, the agreement rate between both techniques was 97.3% (182/187) which indicates that the two methods are approximately equal regarding their capacity to detect dengue virus.

Table 2. Detection of dengue virus after isolation in Vero cells

Plaque assay in BHK-21 cells		ELISA		FC	
+	-	+	-	+	-
57		48	9	45	12
	130	0	130	0	130

The validation of dengue vaccine candidates in a non-human primate model relies not only on the detection of virus in serum, but also on its quantification. Therefore, having a quantitative method to analyze viremia in monkeys, in addition to highly sensitive isolation systems, is of paramount importance for vaccinologists. The two methods used in this work provide a measure of the amount of virus present in serum samples. In the case of flow

cytometry, infective viral particles are quantified through the percentage of infected cells. In turn, ELISA allows determining the level of virus present in the culture supernatant, independently of its viability.

Figure 1A shows a linear regression between the levels of viremia detected by both techniques for a data set of 112 serum samples. The significant linear relation ($r^2=0.9181$, $p<0.0001$) indicates that, in addition to the similar dengue virus detection rates, ELISA and flow cytometry yielded similar quantification patterns. Figure 1B illustrates this fact with three representative animals. These monkeys were selected from those with at least one day of positive detection and are representative of the minimum (0.6821), average (0.9441) and maximum (0.9942) correlation coefficients.

To our knowledge, ELISA has not been used for detecting and quantifying dengue virus. Since ELISA is a cheap and simple technique, these results justify its potential application in dengue viremia studies beyond its current employment in serological assessment. In turn, FC has been used to detect dengue virus in different cell lines¹ and a flow cytometry-based assay for measuring dengue virus neutralization has been reported recently¹³. However, FC has not been used before to quantify viremia in monkey serum samples. Therefore, our results provide evidences for the first time that these techniques can be reliably used for the detection and quantification of viremia in non-human primates.

Although plaque assay is the gold-standard for the detection and quantification of viremia in non-human primate models and is a highly sensitive method, most clinical isolates do not produce distinct plaques on cell culture monolayers. This poses a problem for the evaluation of the protective efficacy of vaccine candidates against circulating dengue virus strains. RT-PCR is another highly sensitive method that can be used for this purpose⁴, but it may amplify plasmatic viral genomes from non-infective immune complexes or viral fragments, leading to misinterpretation of results. Since ELISA is a simple, economic and time-saving method, our findings support its potential use for dengue virus detection and quantification after viral isolation in cell culture.

In summary, here we report a preliminary study on the performance of methods for the detection of viremia in monkeys infected with dengue virus. We found evidence that the area of the cell monolayer in different cell culture formats may influence the results of subsequent virus detection. Moreover, we demonstrated that flow cytometry and ELISA have similar sensitivity when applied to the same serum sample. Finally, this work evidences the need for a more thorough statistically founded study of the advantages and disadvantages of the methods available for virus detection. A reliable comparison of the techniques used for the detection of viremia in monkeys is required for the scientific community to adopt a standard procedure in dengue vaccine assessment.

References

1. World Health Organization. Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention, and Control. 2009. Accessed 10 March 2015. Available in: <http://www.who.int/rpc/guidelines/9789241547871/en/>.
2. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JB, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013; 496:504-7.
3. Sariol CA and White LJ. Utility, limitations, and future of non-human primates for dengue research and vaccine development. *Front Immunol* 2014; 5:452.
4. Mungrue K. The laboratory diagnosis of dengue virus infection, a review. *Advance Laboratory Medicine International* 2014; 4:1-8.
5. Barbana V, Munoz-Jordan JL, Santiago GA, Mantela N, Girerda Y, Gulliaa S, Claudea JB, Lang J. Broad neutralization of wild-type dengue virus isolates following immunization in monkeys with a tetravalent dengue vaccine based on chimeric Yellow Fever 17D/Dengue viruses. *Virology* 2012; 429:91-98.

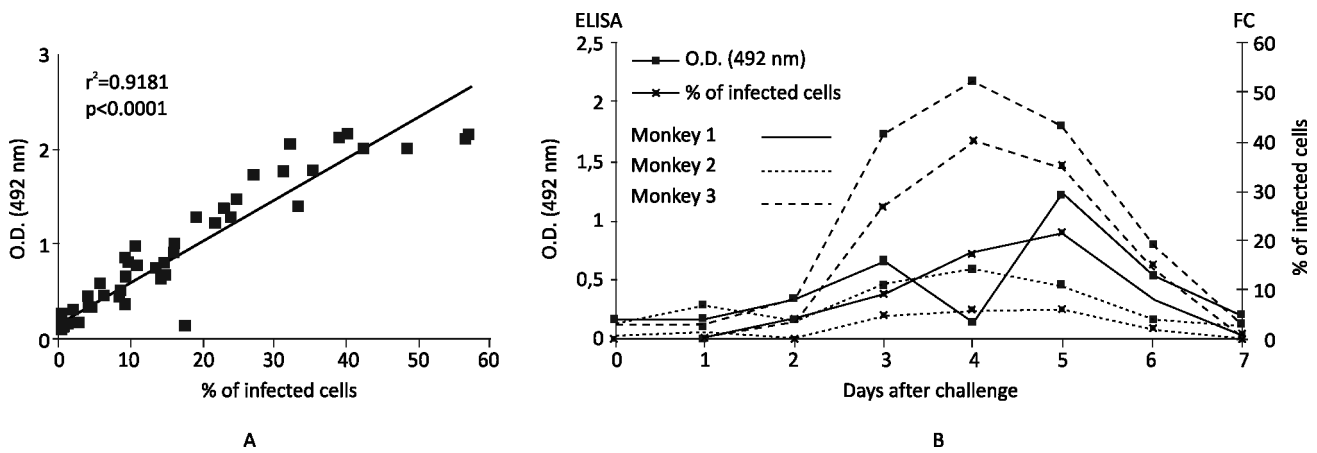


Figure. Comparison of the viremia quantification patterns obtained by ELISA and flow cytometry (FC). **A.** Linear regression between the percentage of infected cells measured by FC and the OD_{492nm} measured by ELISA from 112 non-human primate serum samples. R-squared and p-value of the regression are shown. **B.** Viremia levels as measured by ELISA and FC during the first 7 days upon dengue virus infection. For simplicity, only three monkeys, selected from those having at least one day with positive detection, are shown. Monkeys 1, 2 and 3 have, respectively, the minimum, average and maximum correlation between measurements by both techniques.

- Kraus AA, Messer W, Haymore LB, de Silva AM. Comparison of Plaque- and Flow Cytometry-Based Methods for Measuring Dengue Virus Neutralization. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3777-3780.
- Liu L, Wen K, Li J, Hu D, Huang Y, Qiu L, Cai J, and Che X. Comparison of Plaque- and Enzyme-Linked Immunospot-Based Assays To Measure the Neutralizing Activities of Monoclonal Antibodies Specific to Domain III of Dengue Virus Envelope Protein. *Clin Vaccine Immunol* 2012; 19:73-78.
- Morens DM, Halstead SB, Repik PM. Simplified plaque reduction assay for Dengue viruses by semimicro methods in BHK 21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol* 1985; 22:250-4.
- Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:480-96.
- Putnak R, Barvir DA, Burrous JM, Dubois DR, D'Andrea VM, Høke CH et al. Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vac-

- cine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. *J Infect Dis* 1996; 174:1176-84.
- Kochel TJ, Raviprakash K, Hayes CG, Watts DM, Russell KL, Gozalo AS, et al. A dengue virus serotype-1 DNA vaccine induces virus-neutralizing antibodies and provides protection from viral challenge in Aotus monkeys. *Vaccine* 2000; 18:3166-73.
- Raviprakash K, Ewing D, Simmons M, Porter KR, Jones TR, Hayes CG et al. Needle-free Biojector injection of a dengue virus type1 DNA vaccine with human immunostimulatory sequences and the GM-CSF gene increases immunogenicity and protection from virus challenge in Aotus monkeys. *Virology* 2003; 315:345-52.
- Kraus AA, Messer W, Haymore LB, de Silva AM. Comparison of plaque and flow cytometry-based methods for measuring dengue virus neutralization. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 377.

Recibido: 17 de enero de 2016.

Aprobado: 23 de marzo de 2016.

CIMAh[®] (nimotuzumab) <http://www.cimaher.com/>



Alcanza CIMAh[®] registro sanitario en Ecuador. El antitumoral, CIMAh[®], es una inmunoglobulina humanizada, de isotipo IgG1 que reconoce una secuencia situada en el dominio externo del receptor del EGF humano (EGF-R), CIMAh[®].

Está indicado en el tratamiento de tumores de cabeza y cuello en estadios avanzados en combinación con radioterapia y/o quimioterapia. Tratamiento de astrocitoma de alto grado de malignidad como monoterapia en niños refractarios a tratamiento oncoespecífico y de glioblastoma multiforme en combinación con radioterapia en pacientes adultos y en el tratamiento de tumores de esófago.

CIMAh[®] bloquea la unión del EGF al receptor de EGF, inhibe la activación de la actividad tirosina-quinasa del receptor inducida por la unión del EGF e inhibe el crecimiento tumoral en modelos de tumores humanos xenoinjertados en ratones inmunodeficientes y atímicos.

CIMAh[®] posee un potente efecto anti-angiogénico *in vitro* e *in vivo* inhibiendo la producción de factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y tiene una importante propiedad pro-apoptótica en experimentos *in vivo*. CIMAh induce una respuesta anti tumoral objetiva (remisión parcial o total). En combinación con Radioterapia la respuesta objetiva se incrementa y no se observaron evidencias de toxicidad clínica severa.

CIMAB S.A., Calle 206 No 1926 ATABEY Playa,
Ciudad de La Habana CUBA
Tel.: (53) 72725162, 72725163, 72715057
Fax: (53) 72733509
Email: cimab@cim.sld.cu

Dr. Jorge Enrique Mayo Fernández. MSc.
Representante del Grupo de las Industrias Biotecnológica y Farmacéutica. BioCubaFarma.
Gerente General de Norville Ecuatoriana Cía.Ltda.
cel: (593)-0983333520
Telefax: (593)-02-3325047

INVESTIGACIÓN / RESEARCH

Administración del HeberFERON en el carcinoma basocelular palpebral a propósito de 2 casos

Administration HeberFERON in the eyelid basal cell carcinoma about 2 cases

Irene Rojas Rondón ¹, Yaquelin Duncan Roberts ², Clara G. Gómez Cabrera ¹, Lázara K. Ramírez García ¹, Lázaro Vigoa Arangu-ren ¹, Reinier Hernández Rodríguez ², Angela Turo Iglesias ², Iraldo Bello Rivero ²

DOI. 10.21931/RB/2016.01.02.6

RESUMEN

El cáncer constituye en Cuba la primera causa de muerte y actualmente, dentro de los países de América Latina y del Tercer Mundo, nuestro país presenta una de las mayores tasas de incidencias del cáncer de piel no melanoma. El Carcinoma basocelular (CBC) es el más frecuente y específicamente el palpebral, ocupa aproximadamente el 90 % de los tumores malignos oculares. La cirugía es el tratamiento de elección de estos. En numerosas ocasiones por la extensión, localización, tipo de tumor, antecedentes de reiteradas cirugías, esta genera gran pérdida de tejidos por lo que los resultados estéticos así como funcionales, no son los más deseados, tanto para el cirujano como para el paciente. En estos casos otras opciones de tratamiento pueden ser utilizados para garantizar una mejor calidad de vida a los mismos. Se presentan dos pacientes con diagnóstico de CBC palpebral por biopsia incisional en los que por características de la lesión, localización y antecedentes personales del paciente, se decide realizar tratamiento médico con HeberFERON perilesional. El resultado en ambos casos fue satisfactorio, se logró la eliminación del tumor con buenos resultados estéticos y funcionales, sin recidiva de la lesión durante los 2-3 primeros años de seguimiento.

Palabras clave: Carcinoma basal de párpado, tratamiento con interferones, tumores palpebrales.

ABSTRACT

Cancer is once again the first cause of death in Cuba, and currently among the Latin-American countries and the third world, thus according to estimates, our country has the highest incidence rate of non-melanoma skin cancer. The Basal cell carcinoma (BCC) is the most frequent and specifically the BCC palpebral, occupies 90% of ocular malignancy. Surgery is the treatment of choice. Depending on extension, location, type of tumor, a history of repeated surgeries, surgery generates great loss of tissue so the aesthetic and functional results are not the most desirable for both surgeon and patient. In these cases other treatment options can be used to ensure a better quality of life. Two patients were diagnosed with BCC palpebral by incisional biopsy in which lesion characteristics, location and the patient history, it was decided to perform medical treatment with perilesional HeberFERON. The result in both cases was satisfactory; tumor removal was achieved with good aesthetic and functional results, no recurrence of the injury during the first 2-3 years of follow-up.

Keywords: Basal cell carcinoma of eyelids, treatment with HeberFERON, tumors eyelids.

Introducción

El cáncer constituye en Cuba la primera causa de muerte y el cáncer de piel presenta la tasa más elevada de incidencia para ambos sexos, ¹⁻³ mostrando una tasa de 55,46 por 100 000 habitantes. ⁴ Según los datos que aparecen reflejados en el Anuario estadístico de salud de Cuba 2014 y en el Registro Nacional del Cáncer, el de piel presenta la tasa más elevada de incidencia tanto para el sexo masculino como para el femenino, ⁵ el Carcinoma basocelular (CBC) el más frecuente y específicamente el CBC palpebral, ocupa aproximadamente el 90 % de los tumores malignos oculares. ⁶ La cirugía es el trata-

miento de elección de estos. ^{7,8} Los Carcinomas basocelulares extensos con implicaciones de riesgo estético y funcional, son un gran reto para el cirujano, la cirugía en estos casos genera gran pérdida de tejidos, lo que demanda una Cirugía Plástica considerable. Cuando la lesión es muy extensa o infiltra estructuras oculares, como el borde palpebral y la vía lagrimal excretora, se realizan técnicas de reconstrucción palpebral como el cierre con colgajos o injertos de piel; el objetivo de las mismas es la restauración del volumen perdido, la creación de estructura y la reconstrucción funcional. Estas pueden dejar como secuelas malas posiciones palpebrales y cicatrices inestéticas, aún en manos expertas. Si la lesión se extiende hacia órbita y/o hueso, puede ser necesario

¹ Instituto Cubano de Oftalmología "Ramón Pando Ferrer". La Habana, Cuba.

² Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba.

Correspondencia a: Dra. Irene Rojas Rondón. Calle 76 entre 31 y 41. Marianao. La Habana. Cuba. CP 10600.

Email: irojas@infomed.sld.cu

extirpar estructuras oculares o el ojo en su totalidad, así como parte de los huesos faciales si están afectados. En ocasiones, es necesario combinar la cirugía con radioterapia, sumándose además las múltiples complicaciones de esta última terapia.

Esta situación hace necesario encontrar nuevas opciones terapéuticas con el fin de lograr altas tasas de curación, evitar las recidivas, alcanzar un buen resultado estético, así como disminuir la discapacidad visual por esta causa. El tratamiento con HeberFERON se ha desarrollado con éxito y de forma segura en el tratamiento del CBC de cualquier subtipo, tamaño y localización.⁹

Tomando en cuenta la necesidad de hallar nuevas variantes terapéuticas para el tratamiento de los CBC palpebrales extensos con implicaciones de riesgo estéticos y funcionales, la eficacia demostrada de la combinación de los Interferones (IFNs) alfa y gamma en el tratamiento de estos tumores y el desarrollo de una nueva formulación que combina a estos IFNs (HeberFERON), se decide aplicar en dos pacientes esta formulación para explorar la seguridad del tratamiento perilesional, su efecto, el tiempo de respuesta y la ocurrencia de recidiva. La poderosa razón que justifica e induce a profundizar en el comportamiento evolutivo en este tipo de terapia en pacientes con tumores malignos de párpados, es la posibilidad de impedir que progresen a estadios más graves de la enfermedad, así como evitar otras conductas más agresivas que se utilizan con frecuencia en este tipo de pacientes y mejorar la calidad de vida de los mismos.

Casos clínicos

Caso 1

Paciente de 38 años, color de la piel blanca, sin antecedentes patológicos personales ni familiares. Acude a nuestro servicio por presentar desde hace un año lesión en el canto interno del ojo izquierdo (OI), que en un inicio fue pequeña, pero con el tiempo aumentó de tamaño. Al examen oftalmológico se observa: Lesión que se extiende a todo el canto interno, eritematosa, con zonas de ulceración, bordes mal definidos, acompañado de neovasos en la superficie, no se encuentran linfadenopatías (Fig. 1A).

Tras la exploración y el examen general, se decide indicar complementarios y biopsia incisional, esta última con diagnóstico presuntivo de CBC. Se realiza biopsia (B-14-325) que informa: Fragmento de piel correspondiente con un CBC bien diferenciado con carácter infiltrativo hacia el plano muscular.

Los exámenes de laboratorio hemoquímicos (hemoglobina, hematocrito, leucograma con diferencial, recuento de plaquetas, Alanino aminotransferasa [ALAT], Aspartato aminotransferasa [ASAT], glicemia y creatinina), se encontraron dentro de rangos normales. Estos se indican al igual que la biopsia incisional como protocolo antes de indicar el uso del HeberFERON.

Se discute el caso en colectivo de especialistas y se decide no realizar tratamiento quirúrgico teniendo en cuenta la extensión

y localización de la lesión, que ocupa todo el canto interno, zona de difícil abordaje para reconstrucción palpebral. Se indica tratamiento con HeberFERON. La dosis indicada fue de 3,5 MUI, 1 aplicación perilesional 2 veces a la semana por 5 semanas. A la tercera semana del procedimiento, se observa muy buena respuesta al tratamiento con una evidente reducción de la extensión de la misma (Fig. 1B). Al final del tratamiento, quinta semana, se evidencia ausencia de tumor en toda la zona tratada. Se obtiene una respuesta completa clínica al tratamiento, el cual se mantiene sin recidiva de la lesión en los dos primeros años de seguimiento (Fig. 1C).

Caso 2

Paciente masculino de 51 años, raza mestiza, sin antecedentes patológicos familiares, antecedentes de trauma ocular en el ojo derecho, que deja como secuela ojo ciego. Acude por presentar lesión en el párpado inferior OI (ojo único) de 2 años de evolución que en un inicio fue pequeña, pero en el último mes notó que aumentó de tamaño, sangrando en ocasiones. El especialista del área indicó tratamiento con tetraciclina ungüento tres veces al día y el paciente por decisión propia también decide realizar curas con rojo acetyl. Al mantenerse sin mejoría del cuadro clínico acude a nuestro centro.

Examen oftalmológico: Se observa lesión en párpado inferior, zona medial, aproximadamente 2 cm, bordes elevados y bien definidos, zona central ulcerada, con múltiples neovasos en toda la periferia de la lesión (Fig. 2A).

Por las características de la lesión (tamaño, localización), edad y antecedentes patológicos personales del paciente, se decide realizar biopsia incisional con la impresión diagnóstica de CBC nódulo-ulcerativo del párpado inferior OI.

Biopsia incisional (B-13-20): Fragmento de piel correspondiente con un CBC poco diferenciado, con un componente notable de células fusiformes, anaplásicas.

Se decide optar por el uso de HeberFERON perilesional, a razón de 3,5 MUI dos veces a la semana por 5 semanas. A las 5 semanas de tratamiento se confirma no eliminación total de la lesión, pero si una reducción de más del 20 % de sus diámetros iniciales, con pérdida de los neovasos (Fig. 2B), lo que permitió realizar la exéresis total de la lesión, con cierre directo, sin tener que recurrir a otras técnicas reconstructivas (Fig. 2C). A los 3 años de seguimiento no hay evidencia de recidiva de la lesión, comprobado por examen dermatoscópico que informa presencia de vasos sanguíneos y cicatriz quirúrgica, no tumor.

Discusión

Los pacientes presentados demuestran lo controversial que puede resultar la conducta ante estos casos; la edad del paciente,

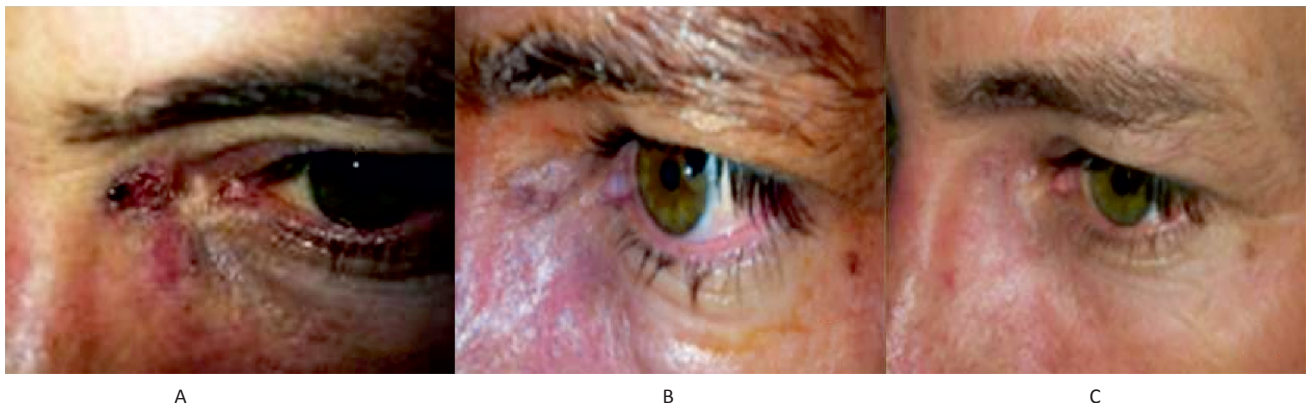


Fig. 1. Paciente masculino de 38 años. **A.** Obsérvese lesión eritematosa, bordes mal definidos, que ocupa todo canto interno OI. **B.** Reducción de la lesión, menos elevada, no ulcerada y ausencia de neovasos a la tercera semana de tratamiento. **C.** Después del tratamiento con HeberFERON.

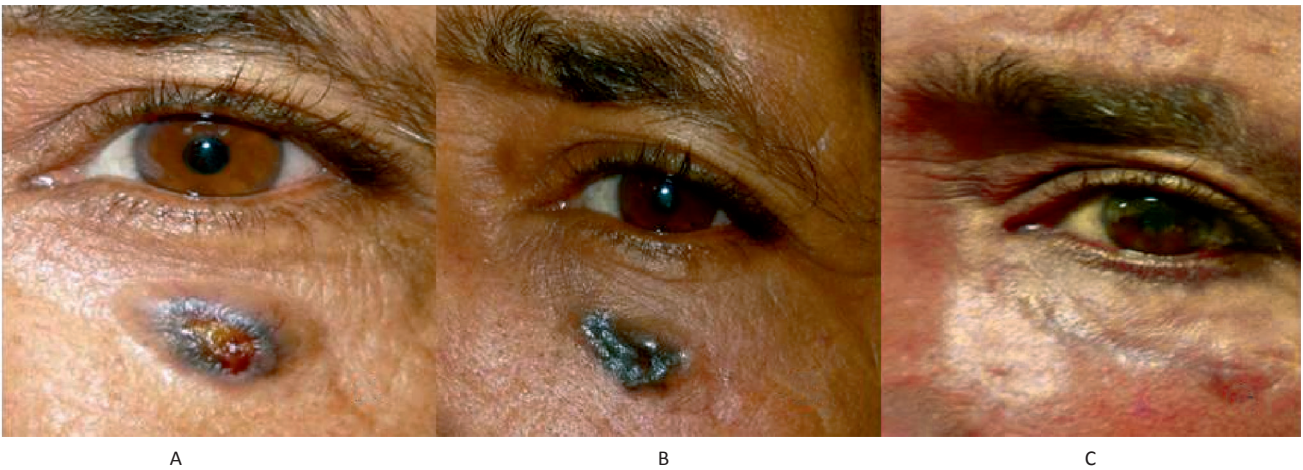


Fig. 2. Paciente masculino de 51 años. **A.** Obsérvese lesión Nódulo-ulcerativa, de 2 cm de diámetro, con múltiples neovasos en la periferia, pigmentada, localizada en PI OI. **B.** Evidente reducción de la lesión, ausencia de neovasos así como de úlcera central. **C.** Exéresis total de la lesión, con cierre directo.

la extensión y localización de la lesión, tipo de tumor, número de lesiones, ocupación, antecedentes personales, así como el factor estético, deben tenerse en cuenta para la toma de decisiones.

La accesibilidad a las numerosas opciones de tratamiento, también será un factor a tener en cuenta, la técnica Micrográfica de Mohs es la técnica quirúrgica de elección en la mayoría de los casos, pero requiere de un equipamiento costoso, al igual que la terapia fotodinámica, muy útil para el tratamiento de tumores malignos superficiales múltiples, sin embargo, no se considera una buena opción en tumores de alto riesgo. En el caso de la crioterapia se ha utilizado en los tumores menores de 10 mm y el éxito de curabilidad solo ha sido reportado para tratar lesiones pequeñas.

En estos pacientes de optar por el tratamiento quirúrgico, se realizaría la técnica de colgajos rotados o injertos, en ambos casos los tumores son extensos por lo que la extirpación de los mismos requiere eliminar gran volumen de tejido, más si se tiene en cuenta el margen oncológico. El cierre primario sería imposible por el defecto tan grande que se produce después de una exéresis tumoral, lo que conllevaría a que estos se realizaran con una tensión excesiva y provocaría cicatrices desfavorables, por su parte, las principales desventajas del uso de injertos en los párpados, son las diferencias en la pigmentación y el aspecto de parchado que resulta estéticamente inaceptable para el paciente y el cirujano.¹⁰ En los pacientes jóvenes, el factor estético es un factor importante a la hora de decidir conducta.

En el primer caso la lesión se encuentra muy próxima a la vía lagrimal excretora, por lo que el abordaje de la zona podría implicar riesgo funcional. Hay que tener en cuenta la ocupación, este paciente se desempeña como artista de circo (payaso), por lo que demanda tener en cuenta los resultados estéticos ya que esta labor requiere del contacto directo con los niños. En el segundo caso, además de las características de la lesión y complejidad de la cirugía, se tuvo en cuenta, los antecedentes personales del paciente, ya que el mismo presenta el ojo derecho ciego, su ojo izquierdo es único, la cirugía implicaría resección de gran cantidad de tejido, corriendo riesgo de complicaciones palpebrales postquirúrgicas (ectropión o triquiasis), que como secuela pudieran provocar alteraciones en la integridad ocular (queratitis punteada superficial, úlceras corneales).

En ambos pacientes se propone como opción terapéutica el HeberFERON, con el objetivo de eliminar la lesión o reducir su tamaño, para luego realizar cirugía exéretica, disminuir riesgo de recidivas, alcanzar un buen resultado estético y funcional, así como disminuir la discapacidad visual por esta causa.

En el mecanismo exacto de acción de los IFNs se invocan la supresión de la proliferación celular, aumento de la fagocitosis

por los macrófagos, inhibición de la replicación viral, inhibición de la angiogénesis y el aumento de la respuesta inmune celular de linfocitos T.¹¹

Se han publicado excelentes resultados con la administración del IFN alfa-2b por vía perilesional, que consigue una regresión total de la lesión, pudiéndose utilizar en tumores primarios y recidivantes. Ha sido propuesto como una opción no quirúrgica en CBC perioculares, de forma aislada o como complemento de la cirugía. El periodo de tratamiento es variable en dependencia del esquema de tratamiento escogido.¹² El HeberFERON tiene sus ventajas debido a la actividad inmunomoduladora y a su potente efecto antiproliferativo, por lo que se ha empleado de forma segura en Cuba a través de ensayos clínicos diseñados por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Habana (CIGB), en pacientes con CBC de cualquier tamaño, localización y subtipo clínico e histológico en diferentes hospitales.¹³⁻¹⁷ El resultado de la aplicación de esta formulación en los pacientes del estudio, fue satisfactorio, en ambos se reportó un mínimo de eventos adversos pertenecientes al síndrome pseudogripal como cefalea, fiebre y artralgia, que desaparecieron con la aplicación del tratamiento sintomático. Se logró la eliminación del tumor obteniéndose buenos resultados estéticos y funcionales.

Referencias bibliográficas

1. Ministerio de Salud Pública. Anuario Estadístico de Salud. 2014. p. 11. La Habana 2015. [en línea]. <http://www.sld.cu/sitios/dne/>
2. Registro Nacional del Cáncer. Sección independiente para el control del cáncer (SICC). Último reporte, 2011.
3. Rojas RI, Diéguez C, Ramírez G, Gómez C, Carrazana P, Padilla G. Tratamiento quirúrgico de las afecciones palpebrales en pacientes adultos mayores. Rev. Cubana Oftalmol. 2013. [citado 2014 Ago. 13]; 26(1). Disponible en: <http://www.revofthalmologia.sld.cu/index.php/oftalmologia/article/view/172/html>.
4. Victoria Bárzaga HO. Caracterización clínica e histopatológica del cáncer cutáneo no melanoma. Revista Archivo Médico de Camagüey. May 2010 [citado 20 Jun 2011]; 14(3). Disponible en: <http://scielo.sld.cu/>
5. Ministerio de Salud Pública. Anuario Estadístico de Salud. 2014. p. 11. La Habana 2015. [en línea]: <http://www.sld.cu/sitios/dne/>
6. Prokosch V, Thanos S, Spaniol K, Stupp T (2011) Long-term outcome after treatment with 5% topical imiquimod cream in patients with basal cell carcinoma of the eyelids. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 249: 121-125.
7. Eguía Martínez F, Rio Torres M, Capote Cabrera A. Manual de Diagnóstico y Tratamiento en Oftalmología. La Habana. Editorial Ciencias Médicas; 2009.

8. Melgares Ramos MA, Pardo Lora C, Salazar Rodríguez S, Silveira Melgares Y. Comportamiento de los tumores malignos de los párpados en el Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. La Habana. Rev Cubana Oftalmol. 2013; 26(2). Disponible en: <http://www.revofthalmologia.sld.cu/index.php/oftalmologia/article/view/47/html>
9. Informe Periódico de Seguridad del HeberPAG. 2013. Dirección de Investigaciones Clínicas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.
10. Gutiérrez A. M, Ulloa S. J, Ulloa B. P. Colgajos cutáneos en cirugía oncológica facial. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello 2012; 72: 49-56.
11. Cigna E, Tarallo M, Maruccia M, Sorvillo V, Pollastrini A, Scuderi N. Basal Cell Carcinoma: 10 Years of Experience. J. Skin Cancer. 2011 [citado 17 de junio de 2014]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2011/476362>.
12. Good, L. M., M. D. Miller y W. A. High. (2011): Intralesional agents in the management of cutaneous malignancy: a review. J Am Acad Dermatol, 64(2): 413-422.
13. Bello I, López P, García Y, Santana H, Aguilera A, Páez R, Anasagasti L. Patente No 2005-0213. Formulaciones estabilizadas que contienen a los interferones gamma y alfa en proporciones potenciadoras. OCPI 2005.
14. Anasagasti, A. L., Y. García., y S. Barcelona. (2009): Treatment of advance, recurrent, resistant to previous Treatment basal and squamous cell skin carcinomas with a synergistic formulation of interferons. Open, prospective study. BMC. Cancer, 9: 262-270.
15. Bello-Rivero I, Garcia-Vega Y, Valenzuela-Silva C, Bello-Alvarez C, Vázquez-Blomquist D and Lopez-Saura P. Development of a new formulation of interferons (HEBERPAG) for BCC treatment. Cancer Res Ther 2013, 1(10):235-243.
16. Yanisel Jiménez Barbán, Caridad Vega Pupo, Dayamí Vila Pinillo, Glenda Fernández Ychaso, Dr. Vladimir Arias Núñez, Iraldo Bello Rivero. Uso de HeberPAG en carcinoma basocelular periocular. Use of HeberPAG in periocular basocellular carcinoma: a case presentation. Revista Cubana de Oftalmología. 2014 [citado: 20 ene 2016]; 27 (3). Disponible en: <http://revofthalmologia.sld.cu/index.php/oftalmologia/article/view/250>.
17. Garcia-Vega Yanelda, Anasagasti-Angulo Lorenzo, Valenzuela-Silva Carmen, Navarro-Mestre Marianlie, Maribeth-Ordoñez Sintia, Acosta-Medina, Doraiquis, Rodríguez-García MA, Collazo-Caballero Sonia, Tijerino-Arrieta Edgar, Duncan-Roberts Yaquelin, Artega-Hernández Ernesto, Jiménez-Barban Yanisel, Vila-Pinillo Dayami, Torres-Valerio Esteban, Vazquez-Castillo Mariela, López-Saura Pedro1 and Bello-Rivero Iraldo. (2015) Retrospective Study of Periocular Non Melanoma Skin Cancer Treated with the Combination of IFN alpha2b and Gamma (HeberPAG). J Clin Exp Ophthalmol 6: 478. doi:10.4172/2155-9570.1000478.

Recibido: 14 de marzo de 2016.

Aprobado: 5 de mayo de 2016.

ecuamedical
salud & tecnología

**tecnología
al servicio
de la salud**

Av. Eloy Alfaro N29-325 y Alemania, edificio FORTUNE PLAZA
piso 9 Of. 911 Teléfonos 02-380-1557 / 099-662-7078
Quito - Ecuador

Caracterización por Microscopía Electrónica de Transmisión de vacunas y candidatos vacunales basados en nanopartículas

Characterization nanoparticles-based vaccines and vaccine candidates: a Transmission Electron Microscopy study

I. Menéndez¹, L. Hermida¹, A. Hernández², J.C. Aguilar¹, R. Garateix¹, R. Molina¹, D. Pérez², M Pilar. Rodríguez², J. León², V. Falcón¹.

DOI. 10.21931/RB/2016.01.02.7

ABSTRACT

Transmission Electron Microscopy (TEM) is a valuable tool for the biotech industry. This paper summarizes some of the contributions of MET in the characterization of the recombinant antigens are part of vaccines or vaccine candidates obtained in the CIGB. It mentions the use of complementary techniques MET (Negative staining, and immunoelectron) that enhance visualization and ultrastructural characterization of the recombinant proteins obtained by Genetic Engineering.

Keywords: TEM, HBV, NASVAC, Dengue, negative staining, nanoparticles.

RESUMEN

La Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) constituye una herramienta valiosa para la industria Biotecnológica. Este trabajo resume algunos de los aportes de la MET en la caracterización de los antígenos recombinantes que forman parte de vacunas o candidatos vacunales obtenidos en el CIGB. Se hace mención al uso de técnicas complementarias a la MET (Tinción Negativa, y la Inmunomicroscopía) que potencian la visualización y caracterización a nivel ultraestructural de las proteínas recombinantes obtenidas por Ingeniería Genética.

Palabras clave: MET, VHB, NASVAC, Dengue IME, Tinción Negativa, Nanopartículas.

Introduction

The necessity to develop effective drugs against infectious diseases has made electron microscopy a very important tool in the field of Biotechnology. Specifically, the Transmission Electron Microscopy (TEM) contributes to the development of new methodologies in the diagnostic of viral diseases and add new elements to study the mechanisms involved in the pathogenesis of the diseases¹. The combination of TEM and Immunoelectron Microscopy (IEM) has also made the visualization and characterization, at ultrastructural level, of recombinant proteins obtained by genetic engineering possible.

TEM is based on the incidence of a beam of electrons, produced by a cathodic filament, through a sample, and the electronic scattering caused by the atoms composing the structure of the sample². TEM has a resolution in the order of the nanometers, higher than the resolution of the optic microscopy.

TEM has extensively been used in the research and characterization of biotechnological products for human and plant health, based on DNA recombinant techniques, at the Center for Genetic Engineer and Biotechnology (CIGB) in Cuba. For example, using

this method, different systems for the expression of recombinant proteins and diverse methods for the detection of viruses and recombinant proteins in bacteria, yeast and plants have been analyzed.

In this work, we highlight the more important contributions of TEM in the characterization of the nanoparticles conforming the vaccines and vaccine candidates for human and animal uses.

Methods

Negative staining Samples were analyzed using the method. Briefly, the samples were centrifuged 20 minutes, contrasted with uranyl acetate and visualized with a Transmission Electron Microscope Jeol JEM 2000 Ex.

Immunoelectron Microscopy: The samples were incubated with either CBSS-HepB.1 mAb in phosphate buffer, for 45 min at RT. The samples were rinsed three times for 30 min at RT with 0.1% bovine serum albumin in phosphate-buffered saline pH 7.3 (BSAPBS), and incubated for 1 h at RT with gold-labeled (15nm) anti-mouse IgG (Amersham, UK) diluted 1:100 in BSA-PBS. As control the primary antibody was substituted by normal mouse serum.

¹ Biomedical Research, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Ave. 31, P.O. Box 6162, Playa, Havana 10 600, Cuba.

² Agricultural Research, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Ave. 31, P.O. Box 6162, Playa, Havana 10 600, Cuba.

Correspondence: Ivón Menéndez. P.O. Box 6162, Playa, Havana 10 600, Cuba. Phone: 53-7-2504535, Fax: (53-7) 271 4764. Email: ivon.menendez@cigb.cu

Development

The distribution, the morphology and the particle size are important parameters in evaluating the pharmaceutical composition based on virus-like particles (VLP). Nowadays, TEM is still one of the most important analytical tools for the ultrastructural analysis of antigens and proteins (in vaccines and vaccine candidates) obtained by recombinant technology. Different methods have been combined with TEM for the identification and direct classification of viral particles and the detection of strange agents and other contaminants in the samples. Nevertheless, the negative staining method has been preferred because of its simplicity and fidelity³. IEM is one of the most important techniques in the detection and localization of proteins in cells and tissues. This method is based on the detection of the antigen-antibody interaction using a secondary antibody labelled with colloidal gold particles⁴. The sensitivity of TEM highly increases when this method is combined with the IEM.

At CIGB, one of the more important applications of TEM is the characterization of nanoparticles conforming vaccines and vaccine candidates. These nanoparticles can be formed by proteins, protein/lipid or protein/DNA complexes, and they have the property of mimicking supramolecular structures of viruses. They can also induce an antiviral immune response, in terms of neutralizing antibodies and/or a cell-mediated immunity (CMI)⁵. One of the main characteristics of nanoparticulation is their high degree of particulation and/or aggregation caused by covalent and non-covalent molecular interactions. This characteristic allows them to be used as vaccines.⁶ TEM allows the evaluation of the stability, the homogeneity, and the consistency of the particles in the formulation of the production processes of the Hepatitis B and cattle tick vaccines. Moreover, particles composing the vaccine candidates being developed in our institution are also characterized. The Cuban vaccines against Hepatitis B (Heberbiovac[®]) and the cattle tick (Gavac[®]) are distinctive products of CIGB in the biomedical and agricultural departments.

Hepatitis B is a deadly disease caused by the hepatitis B virus. It is a very important global health problem, causing around 600 000 deaths per year⁷ therefore, the development of effective vaccines against the virus is mandatory. Since 1992, the CIGB produces a recombinant vaccine against the Hepatitis B virus. During these years, more than 100 million of doses of this prophylactic vaccine have been distributed in 35 countries. AgsHB is the active pharmaceutical ingredient (API) of the Cuban Hepatitis B vaccine, Heberbiovac[®], which is produced in the yeast *Pichia pastoris*.

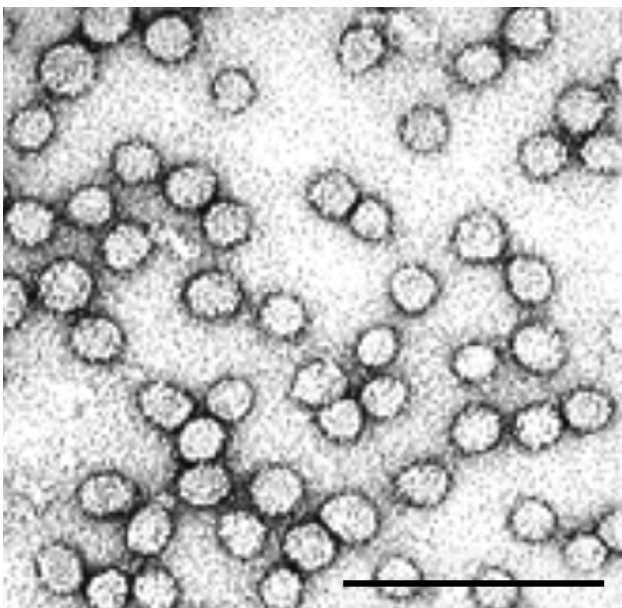


Fig. 1. Vaccine Heberbiovac. Presence of recombinant nanoparticles is observed, approximately 20nm in diameter. Bar = 100nm.

On the other hand, *Boophilus* ticks are the most harmful ectoparasites affecting cattle in Latin America, Australia and some regions from Africa. They cause stress and weakness of the affected animals. From ticks per animal, the damage has economic effects: decrease of the animal weight and milk production, negative effects on the fertility and increase the incidence of other diseases. For this reason, the development of effective vaccines against this disease is crucial⁸. The protein Bm86 is the API of the Cuban vaccine against the cattle ticks (Gavac[®], CIGB, Cuba) produced in the yeast *Pichia pastoris*.

The importance of TEM as quality specification criteria for the release of the Gavac and AgsHB batches during their production processes has been demonstrated. The effectiveness of both vaccines has been related to their high degree of particulation. The experimental results suggest that this characteristic increases their immunogenicity^{9,10}. Using TEM and negative staining, the particulated properties of AgsHB and Bm86 were corroborated (Fig. 1 and 2). These nanoparticles were also analyzed using IEM with monoclonal antibodies highly specific against the APIs (Fig. 3).

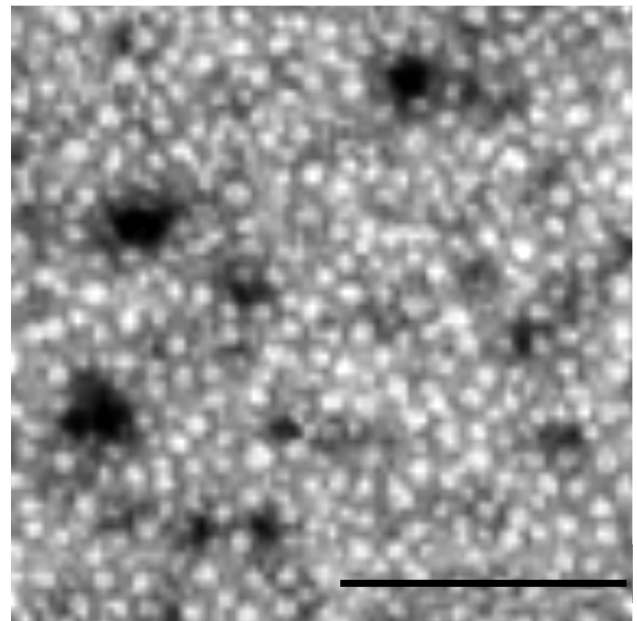


Fig. 2. Vaccine Gavac. Presence of recombinant nanoparticles is observed, approximately 20nm in diameter. Bar = 200nm.

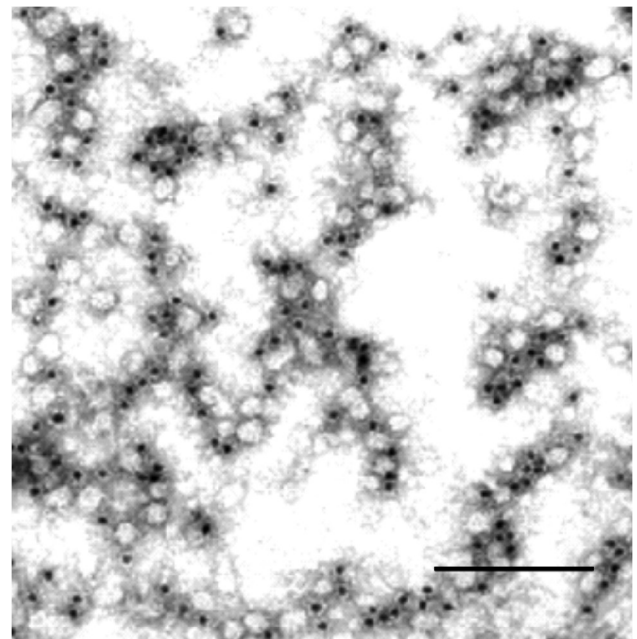


Fig. 3. Vaccine Heberbiovac (Immune Electron Microscopy). Bar =200nm.

Currently, in our institution there are research projects investigating the development of new vaccines against infectious diseases like Hepatitis B and dengue. The new vaccine candidate against hepatitis B (still in developmental process) is focused on a therapeutic use unlike the previous Heberbiovac that has a prophylactic use. The name of this new future product is NAS-VAC and it is based on the combination of the surface antigen (HBsAg) and the nucleocapsid of the hepatitis B virus (HBcAg). Both antigens have sizes similar to the virus: 22-26 nm. This is a key element for their interaction with the immune system and the development of an effective antiviral response.

Therefore, it is important to obtain, after the production processes, homogeneous particles for each antigen. TEM directly enables the identification and characterization of sizes and the morphology of these particles.

Previous studies suggested that some features such as high degree of particulation and aggregation could increase the immunogenicity of the vaccines. Aguilar et. al (2004) also demonstrated that the adhesiveness of the recombinant antigens HBsAg and HBcAg, favor the formation of particulate aggregates in a range between 22-200 nm. Because of this characteristic, the AgcHB provokes a stronger lymphocytes activation. TEM analysis confirms the presence of these particles in different formulations of the vaccine candidate Nasvac (Fig. 4).

Dengue is the most important viral disease transmitted by arthropods affecting the world population. Every year 50-100

millions of new cases of this disease are reported and 500 000 of them, correspond to the hemorrhagic dengue fever, which is the most severe manifestation of the disease. This disease is produced by the dengue virus (DV), which is a viral complex composed of 4 serotypes. Unfortunately, there is not an effective vaccine against dengue. In Cuba, there is a research program for obtaining a subunit vaccine against the four serotypes of the virus. Using TEM it was possible to characterize one of the recombinant proteins constituting the base of the vaccine candidate. This protein, named DIIIC-2, is composed by the domain III of the viral envelope protein and the capsid protein of the dengue-2 virus. These viral regions are antigenic fragments able to induce humoral and cellular immune responses against the virus.

TEM with negative staining demonstrated the presence of particles after the incubation of the protein DIIIC-2 with oligonucleotides of unknown DNA sequence. Valdes et. al. (2009), Gil et. al. (2009) and Marcos et. al. (2013) also demonstrated that after the immunization with these aggregated structures, an immune cellular response and neutralizing antibodies were induced. This response had a protective capacity in mice. It was also demonstrated that the formulation containing the non-aggregated protein did not induce a functional immune response (Fig. 5).

Plants have also been important biotechnology models for the production of recombinant proteins. TEM analysis revealed the presence of spherical viral particles of 27 nm similar to the Hepatitis A virus (HAV) in purified samples from transgenic

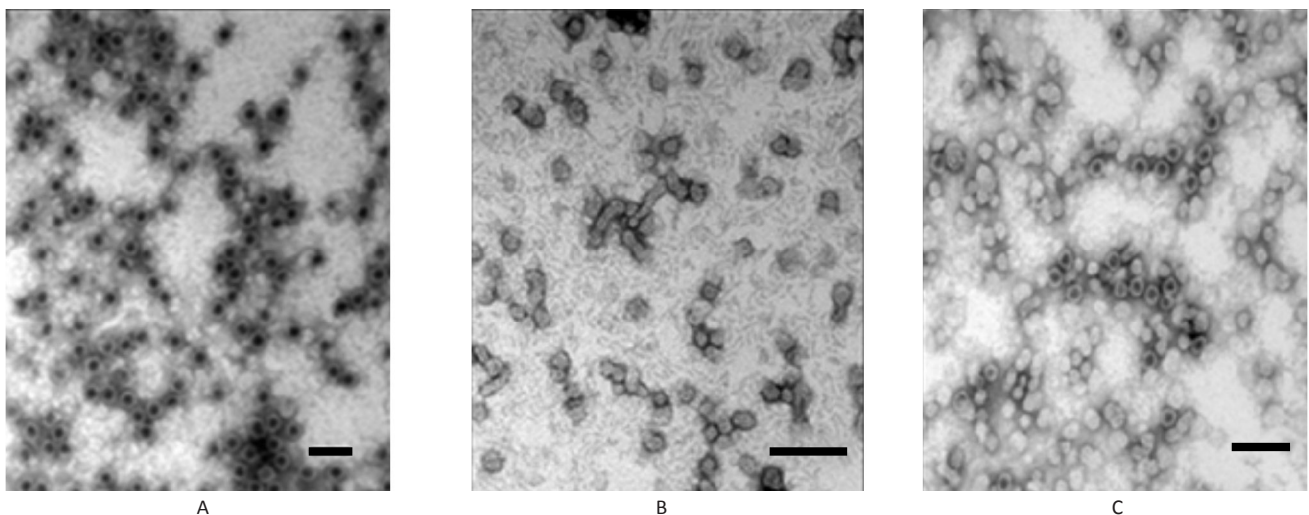


Fig. 4. Presence of recombinant nanoparticles of AgcHB (a), AgsHB (b) and the combined formulation of the Vaccine Candidate NASVAC (c). Bar=100nm.

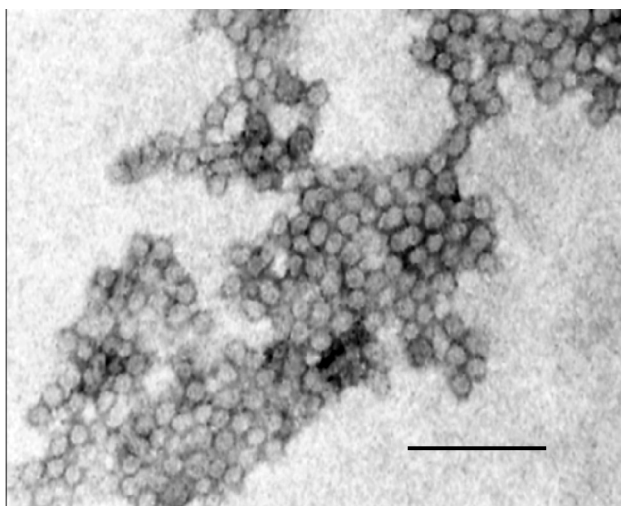


Fig. 5. Vaccine Candidate against Dengue virus. Presence of recombinant nanoparticles is observed, approximately 20nm in diameter. Bar =100nm.

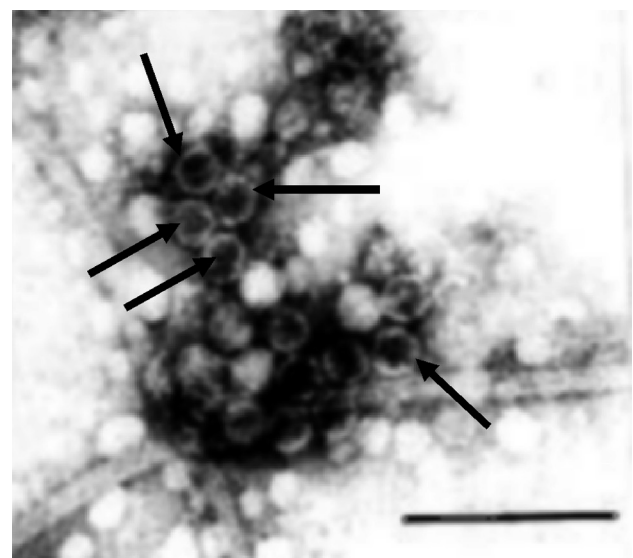


Fig. 6. Vaccine Candidate against VHA virus. The presence of recombinant nanoparticles is observed, approximately 27nm in diameter. Bar = 200nm

tobacco plant expressing HAV open reading frame.¹¹ It was the first report of the production of this antigen in plant being the formation of these particles required to obtain a stronger immune response (Fig. 6).

Conclusions

TEM constitutes a very powerful biotechnological tool for the study of the recombinant nanoparticles. Specifically, we demonstrate here how useful is this method for detecting aggregation states of the nanoparticles conforming the vaccines and vaccine candidates produced and under developed at CIGB. Our group has obtained experiences very useful for the future.

References

1. Jurado SB., Petrucci MA., (2005) "Aplicaciones de la Microscopía Electrónica de Transmisión en el Diagnóstico Microbiológico" *Analecta Veterinaria* 25(1): 18-24.
2. Junqueira LC., Carneiro J. *Histología Básica*. 2006. 10 edición, Masson, SA. Jurado SB., Petrucci MA. *Aplicaciones de la Microscopía Electrónica de Transmisión en el Diagnóstico Microbiológico*. *Analecta Veterinaria*, 2005, 25 (1): 18-24.
3. Almeida JD., A: P Waterson (1969). "The morphology of virus antibody interaction" *Adv. Virus Res.* 15:307-338.
4. An improved procedure for immunoelectron microscopy: ultrathin plastic embedding of immunolabeled ultrathin frozen sections. Keller GA, Tokuyasu KT, Dutton AH, Singer SJ. 1984 Sep;81(18):5744-7.
5. N, Acosta-Rivero, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334 (2005) 901.
6. D. Theugabulova, *Journal of Chromatography, B* 716 (1998) 209.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Hepatitis B vaccination—United States, 1982–2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002; 51:549–563.
8. Canales M, Enríquez A, Ramos E, Cabrera D, Dandíe H, Soto A, Falcón V, Rodríguez M, de la Fuente J. (1997) "Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac against cattle tick" *Vaccine* 15(4):414-22.
9. J. Reyes, T. Rumbaut, I. Menendez, M.C. de la Rosa, M.C. Abrahantes, A. Cruz, I. Rosales and V. Falcón "Ultrastructural study of hepatitis B virus surface antigen by transmission electron microscopy". *Electron Microscopy 1998. Symposium WW, Volume IV*.
10. García – García, JC; Montero, C; Rodríguez, M; Soto, A; Redondo, M; Valdés, M; Méndez, L y De la Fuente, J. (1998) "Effect of particulation on the immunogenic and protective properties of the recombinant Bm86 antigen expressed in *Pichia pastoris*." *Vaccine* Vol 16, N° 4, pp. 374-3.

Recibido: 4 de enero de 2016.

Aprobado: 16 de marzo de 2016.

ANTIBIOTIC RESISTANCE WHAT YOU CAN DO



Antibiotic resistance happens when bacteria change and become resistant to the antibiotics used to treat the infections they cause.



- 1 Only use antibiotics when **prescribed** by a certified health professional
- 2 Always take the **full prescription**, even if you feel better
- 3 **Never use left over** antibiotics
- 4 **Never share** antibiotics with others
- 5 **Prevent infections** by regularly washing your hands, avoiding contact with sick people and keeping your vaccinations up to date

www.who.int/drugresistance

#AntibioticResistance



World Health
Organization

REVISIÓN / REVIEW

Compuestos bioactivos aislados de cianobacterias y microalgas: propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina

Active compounds from cyanobacteria and microalgae: properties and potential applications in biomedicine

Alexey Llopiz¹

DOI. 10.21931/RB/2016.01.02.8

RESUMEN

Las cianobacterias y microalgas son fuentes de productos con aplicaciones potenciales en la industria biofarmacéutica. Entre las estructuras extraídas de estos microorganismos se encuentran: péptidos, proteínas, carbohidratos, terpenoides, ácidos grasos insaturados, flavonoides, compuestos fenólicos, vitaminas, porfirinas, y otros compuestos orgánicos. La naturaleza estructural de estos productos es muy diversa, además la composición química de las microalgas está en concordancia con sus hábitats. Entre las principales propiedades farmacológicas caracterizadas en estos micro-organismos se encuentran las relacionadas con las actividades bactericidas, inmunomoduladoras, antioxidantes, citoprotectoras, fungicidas y antivirales en el contexto de diferentes patógenos. Esto posibilita su posible empleo en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, tumorales así como en procesos infecciosos. En esta revisión se presentan las estructuras químicas y las actividades biológicas de algunos de los compuestos aislados de microalgas, los que pudieran tener aplicaciones potenciales en la industria biofarmacéutica.

Palabras clave: Antibióticos, antivirales, cianobacterias, algas, biofarmacéutico, nutracéutico, ficobiliproteínas.

ABSTRACT

Cyanobacteria and microalgae are source of many chemicals substances with potential applications on biopharmaceutical industry. Many structures have been characterized in these organism, such as: peptides, proteins, carbohydrates, terpenoids, polyunsaturated fatty acids, flavonoids, phenolic compounds, vitamins, porphyrins and other organic substances. Chemicals structures of isolated compounds are diverse and it depends of microalgae habitats. Pharmacological activities located in microalgae are bactericides, immunomodulatory, antioxidants, cytoprotective, fungicides and antivirals. These properties may possible the potential treatment of many diseases including autoimmune disorders, tumoral, and infectious process. In this review are presented and discussed some elements associated to chemical structure and biological activities around of compounds with potential uses as biopharmaceuticals.

Keywords: Antibiotics, antivirals, cyanobacteria, algae, biopharmaceuticals, nutraceuticals, phycobiliproteins.

Introducción

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos, polifiléticos y eucariotas que pueden crecer de manera autotrófica o heterotrófica. Las cianobacterias son procariontes Gram-negativos que aunque originalmente estaban incluidos dentro de las algas posteriormente pasaron a formar parte del dominio de las bacterias. En estos organismos se han identificado compuestos bioactivos con diversos usos potenciales, fundamentalmente en biomedicina, agropecuaria, cosmética y en investigaciones básicas^{1,2}. Estos microorganismos también han sido empleados en la producción de hidrógeno y etanol para la obtención de fuentes alternativas de combustibles³, así como en la industria alimenticia por sus propiedades colorantes y nutricionales⁴.

Las actividades farmacológicas reportadas en compuestos procedentes de cianobacterias y microalgas incluyen antiprotosomas, bactericidas, antivirales, citotóxicas, inhibidores de proteasas o de los canales de calcio, inmunomoduladoras y antioxidantes⁵. Uno de los elementos asociados a la gran diversidad de actividades encontradas es el amplio espectro de metabolitos secundarios presentes en estos organismos³, entre los que se encuentran lipopéptidos, aminoácidos, proteínas, ácidos grasos, macrólidos, amidas, fenoles, alcaloides, compuestos orgánicos de bajo peso molecular y carbohidratos⁶. Adicionalmente la diversidad estructural y funcional de estos sistemas biológicos se incrementa debido a que la composición química de los extractos de estos microorganismos depende de la localización geográfica y de los métodos de extracción empleados⁷. Sin embargo se debe tener en cuenta que

¹Licenciado en Bioquímica. Máster en Biotecnología Mención Investigación de nuevos productos. Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias. Universidad de Las Américas. Sede Queri: calle José Queri s/n entre Av. Granados y Av. Eloy Alfaro, Quito, Ecuador.
Correspondencia: Alexey Llopiz. E mail: alexey-llopiz@outlook.com.

estos microorganismos también pueden contener sustancias tóxicas, las cuales deben ser identificadas y eliminadas de estos sistemas cuando van a ser empleados con fines biofarmacéuticos, nutricionales, etc.⁸.

En esta revisión se presentará una panorámica general desde el punto de vista estructural y funcional de algunos de los principales metabolitos encontrados en cianobacterias y microalgas, que se caracterizan por actividades biológicas que los hacen productos potenciales en la industria biofarmacéutica.

Métodos

Las estructuras químicas fueron dibujadas con el programa Chem Draw⁹ y la visualización de las estructuras 3D se realizó con el programa UCSF Chimera¹⁰.

Compuestos activos aislados de microalgas

Carbohidratos

Entre los metabolitos bioactivos que se han identificado en varias microalgas se encuentran los polisacáridos sulfatados, los que están asociados a actividades antivirales, antibacterianas, antitumorales, antiinflamatorias¹¹ y probióticas^{12,13}. También se han identificado propiedades antioxidantes en varios de estos polisacáridos sulfatados, los que están constituidos fundamentalmente por galactosa, azúcares metilados y anhídridos. Las estructuras sacarídicas más importantes que se encuentran en los extractos de estos organismos son los fucoidanos, las laminarinas, los galactanos y los alginatos¹⁴.

Los fucoidanos son polisacáridos sulfatados extraídos fundamentalmente de algas marinas de color marrón. Estas sustancias están asociadas a la modulación del sistema inmune, inhibición de la proliferación celular¹⁵, actividad anti y proangiogénica¹⁶ y actividad antiviral¹⁷. Un total de ocho estudios realizados en humanos que implican a estos carbohidratos han sido reportados, los que implican la evaluación del efecto anticoagulante¹⁸, inmunomodulador¹⁹ galactofucan sulfato (a putative HPC mobilizing agent) así como las potencialidades para el tratamiento de síndromes metabólicos²⁰.

La estructura química de estos carbohidratos implican a la L-fucosa sulfatada, las que se unen mediante enlaces glicosídicos del tipo α -1,3 (Fig. 1A). Este tipo de compuestos generalmente pueden ser identificadas en *Laminaria saccharina*, *L. digitata*, *Analphus japonicus*, *Cladosiphon okamuranus* y *Chorda filum*.

Otra disposición que se ha caracterizado implica que se alternen enlaces glicosídicos α -1,3 y α -1,4 (Fig. 1B), las que pueden ser encontradas en especies como *Ascophyllum nodosum* y *Fucus*²¹. Adicionalmente se han identificado en estos polisacáridos otros monosacáridos como glucosa, manosa, galactosa, xilosa, ácido úrico así como derivados acetilados, los que también se pueden encontrar unidos con una estereoquímica del tipo β en el contexto del enlace O-glicosídico²².

Los fucoidanos pueden tener diferentes tamaños en función del grado de repetición de la unidad básica estructural, la cual modula las propiedades biológicas de estas estructuras¹⁵. La acción de estos compuestos también está asociada a las diferencias en el estado de carga superficial, las que están determinadas en gran medida por la exposición de los ésteres de sulfato presentes en estos productos naturales²³.

La sustitución de los hidrógenos por grupos sulfatos (SO_3^-) o grupos acetilos (CH_3CO^-) puede ser en las posiciones C2 o C4, y en muy pocas ocasiones en C3 (Fig. 1). Aunque esta estructura se encuentra relativamente conservada en varios fucanos extraídos de algas, puede diferir entre microorganismos incluso de la misma especie²⁴.

Las laminarinas son otra familia de polisacáridos sulfatados que pueden actuar como componentes de la fibra dietética, probióticos, bactericidas, antivirales, antitumorales, sustancias anti-apoptóticas, anti-inflamatorias, anticoagulantes y antioxidantes²⁵. En estos compuestos la estructura repetitiva está constituida por unidades de D-glucosa con uniones del tipo β -1,3 en las cadenas principales y con β -1,6 en las cadenas laterales (Fig. 2). Aunque la relación entre los enlaces del tipo 1-3 y 1-6 varía entre diferentes especies, la relación generalmente se encuentra entre 2-3:1 y los pesos moleculares alrededor de los 5 kDa. Los dos tipos de laminarinas más frecuentes son: M y G (Fig. 2), en dependencia de la estructura del extremo reductor presente en el polisacárido²⁶.

La relación entre cada una de las especies M y G de las laminarinas varía en dependencia del medio del que se extraigan las algas. La salinidad del medio, el nivel de exposición a la luz y la temperatura son algunos de los factores que determinan la estructura de estos polisacáridos así como la potencia de sus propiedades biológicas²⁷. Las modificaciones químicas de estos compuestos (oxidación, reducción y sulfatación) pudieran estar asociada a la potenciación de las actividades biológicas de esta familia de carbohidratos, fundamentalmente asociado a la ruptura de la cadena original con la formación de estructuras de menor peso molecular²⁸.

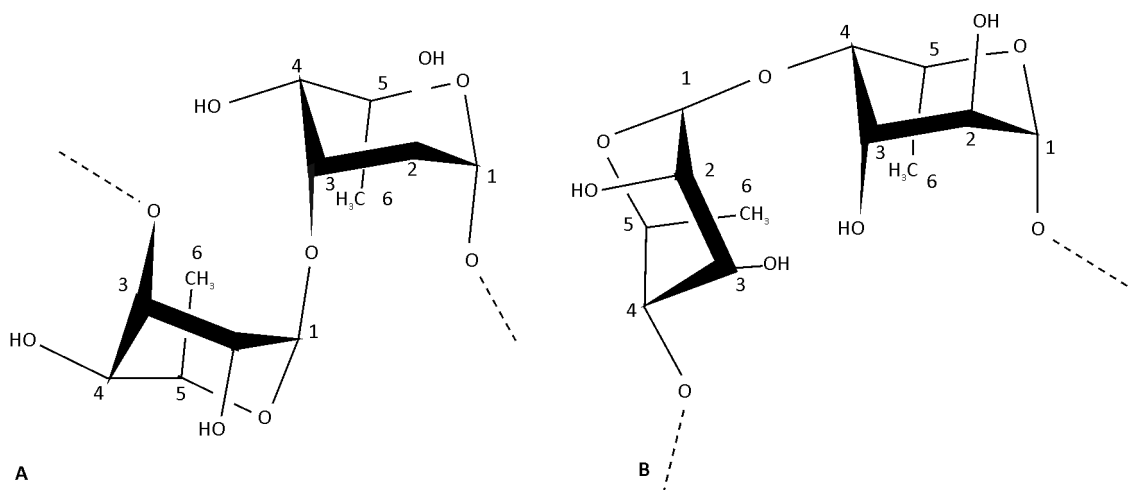


Fig. 1. Estructura general de un fucoidano formado por unidades de L-fucopiranososa. A: unión del tipo α (1-3) y B: unión del tipo α (1-4).

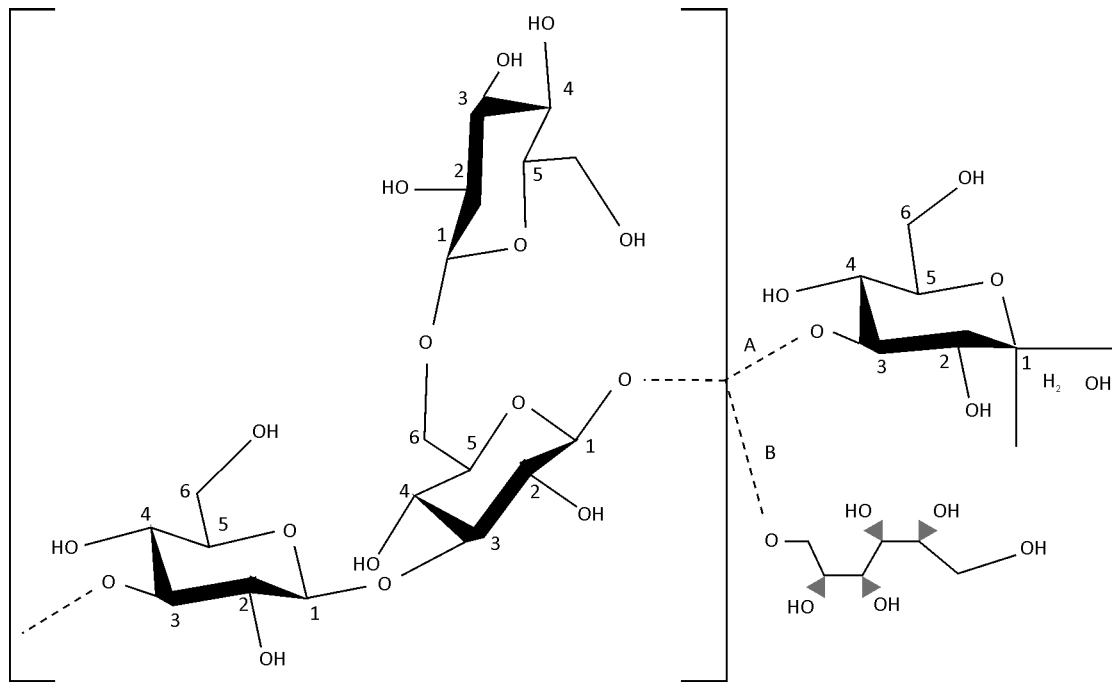


Fig. 2. Estructura general de las laminarinas obtenidas de “algas marronas”. En estos polisacáridos las uniones predominantes entre las glucosas son del tipo β -1,3, las que se ramifican con uniones del tipo β -1,6. Cuando el extremo reductor está formado por D-glucosa (A) estas cadenas se denominan G, y cuando es con un azúcar reducido con el manitol (B), estas cadenas se denominan M. La unidad que se encuentra entre corchetes se repite varias veces. El grado de ramificación varía entre las diferentes fuentes de estos compuestos.

Otra de la familia de carbohidratos extraída de algas son los alginatos. Estos polímeros lineales están conformados por dos tipos de ácidos hexurónicos: ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G), unidos por enlaces del tipo 1,4. Estas estructuras están formadas por bloques del tipo GGGGGG seguidos de bloques MMMMMM y alternado con bloques del tipo GMGMGM (Fig. 3). Aunque en dependencia de la fuente de la que se extraiga este tipo de compuestos varía el contenido de cada uno de los monosacáridos y las dimensiones de cada uno de los

bloques, las masas moleculares de estos carbohidratos se encuentran en el rango entre 32 y 400 kDa²⁹. Estos polisacáridos pueden formar estructuras coloidales y además tener propiedades antiinflamatorias y antibacterianas. Entre las aplicaciones de los alginatos se encuentra la liberación controlada de fármacos, sobre todo en formulaciones que implican la vía oral, debido a la presencia de nanoporos de alrededor de 5 nm en las cápsulas formadas por estos carbohidratos³⁰. Adicionalmente, estas estructuras también han encontrado amplia aplicación en la ingeniería de tejidos²⁹.

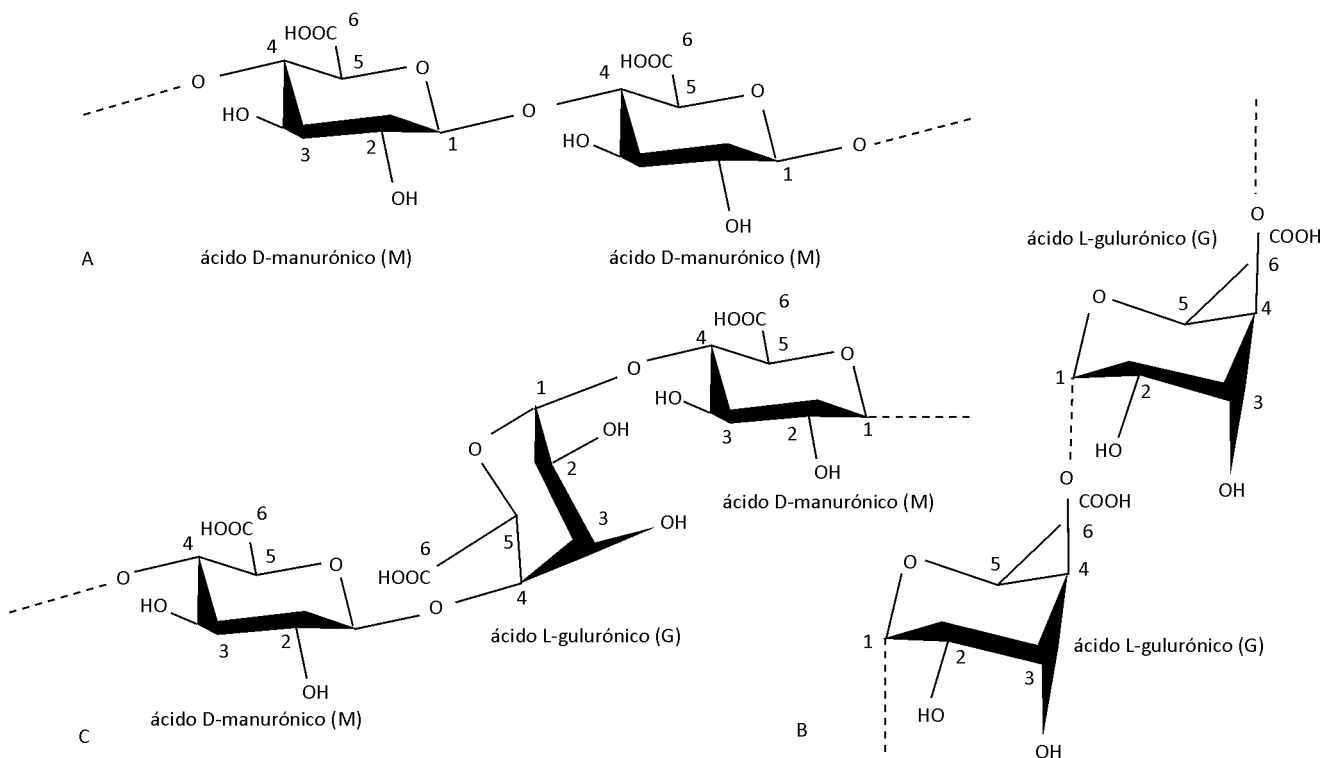


Fig. 3. Estructura general de los alginatos extraídos de microalgas. **A:** uniones O-glicosídicas en bloques entre ácido β -D-manurónico (M) entre las posiciones 1-4. **B:** uniones entre unidades de ácido α -L-gulurónico (G) entre las posiciones 1-4. **C:** uniones entre los epímeros del C-5 entre las posiciones 1-4: ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico.

El Spirulan cálcico (Ca-Spirulan) es otro carbohidrato sulfatado extraído de la cianobacteria verde-azul *Arthrospira platensis*. Este compuesto es un inhibidor de la reverso-transcriptasa de HIV-1, HIV-2, HSV e influenza. Está formado por unidades de ramnosa que se encuentran unidas por enlaces del tipo 1,3 y unidades de 3-O-metilramnosa unidas con una configuración del tipo 1,2. La relación entre estos tipos de enlaces glicosídicos es aproximadamente de 5:3³¹. Adicionalmente en la estructura del Ca-Spirulan se han identificado otros componentes estructurales entre los que se encuentran: manosa, ribosa, fructosa, glucosa, xilosa, galactosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico, iones calcio y sulfato²⁴.

También ha sido extraído de la cianobacteria *N. flagilliforme* el polisacárido Nostoflan, el cual tiene propiedades antivirales contra HSV-1 (HF), HSV-2 (UW-268), HCMV (Towne), Influenza (NWS), Adeno (tipo 2) y Coxsackie (Conn-5). La estructura de este compuesto tiene dos secuencias con la forma (-4)-β-D-

Glc-(1,4)-D-Xylp-(1 y 4)-[β-D-GlcAp-(1,6)-]-β-D-Glc-(1,4)-D-Galp-(1-) (Fig. 4)³².

Otras estructuras con actividades inhibitorias de la reverso transcriptasa y la DNA polimerasa de HIV-1 son los sulfoglicolípidos libres de fósforo encontrados en *Scytonema sp.*³³. Estos compuestos están conformados por un monosacárido sulfatado en la posición 6, que forma un enlace acetálico (C1) con uno de los grupos hidroxilos distales del glicerol. Los sustituyentes de los otros hidroxilos de este alcohol trihidroxílico son dos ácidos grasos (Fig. 5). En el estudio con sulfoquinovosildiacilgliceroles (SQDGs) (1,2-di-O-ácil-3-O-(6-deoxi-6-sulfo-α-D-glucopiranosil)-sn-glicerol) de cinco especies de *Chlorophyta* (algas verdes-azules), 13 del tipo *Rhodophyta* (algas rojas), y tres de la familia *Heterokontophyta* (algas marronas) se identificaron fundamentalmente los siguientes ácidos grasos: ácido palmítico (C16:0), 33.3%; EPA (C20:5), 30.0%; ácido araquidónico (C20:4), 12,7 %; ácido oleico (C18:1); 7,52 %; y ácido esteárico (C18:0); 6,83 %.

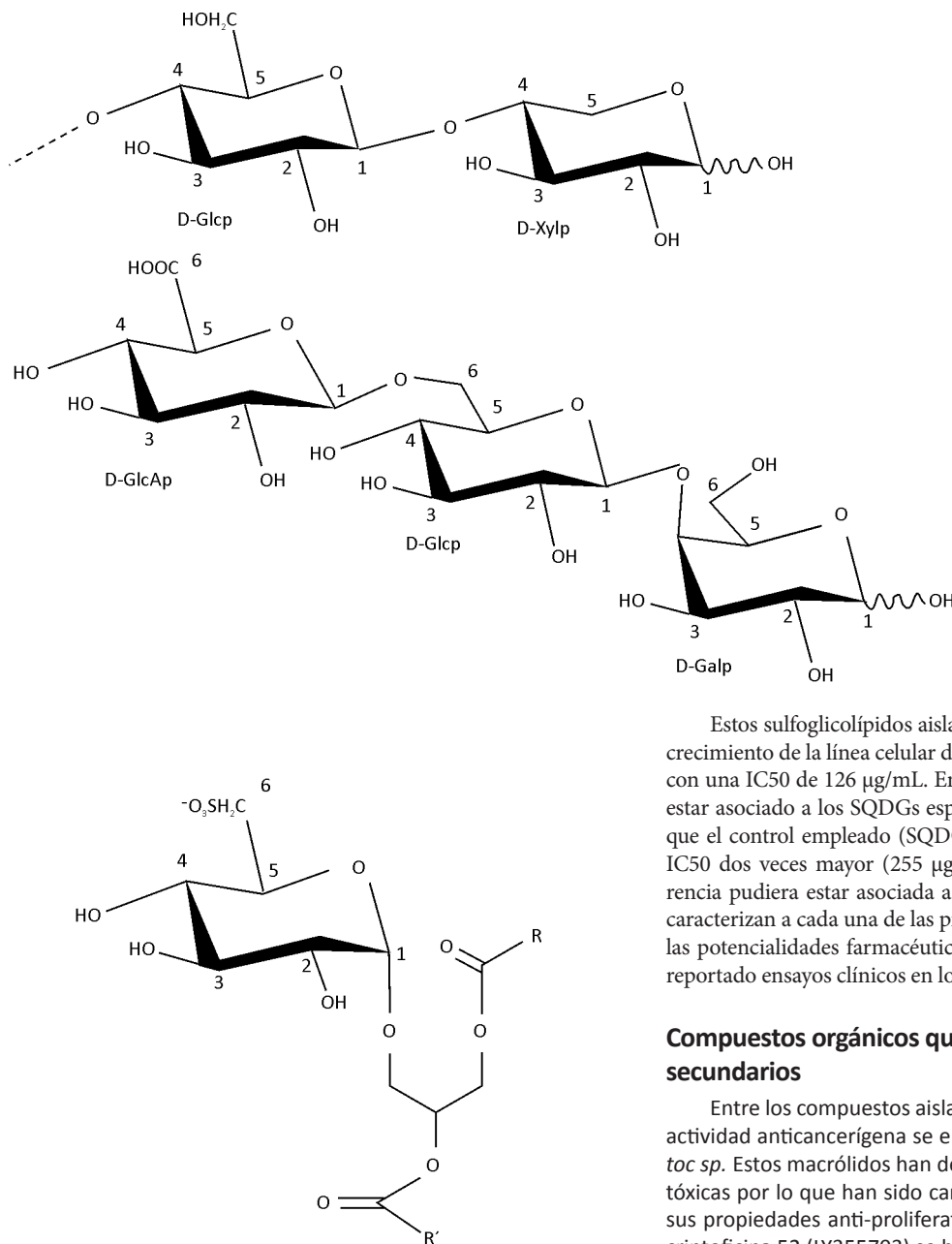


Fig. 4. Estructuras generales del polisacárido Nostoflan extraído de la cianobacteria *Nostoc flagilliforme*. Glcp: glucopiranososa, Xylp: xilopiranososa, GlcAp: ácido glucurónico, Galp: galactopiranososa.

Estos sulfoglicolípidos aislados por Tsai y Sun³³ inhibieron el crecimiento de la línea celular de carcinoma hepatocelular HepG2, con una IC₅₀ de 126 μg/mL. En cierta medida este efecto pudiera estar asociado a los SQDGs específicos de estas preparaciones, ya que el control empleado (SQDGs aislados de espinaca) tuvo una IC₅₀ dos veces mayor (255 μg/mL). Presumiblemente esta diferencia pudiera estar asociada a las distintas relaciones n6/n3 que caracterizan a cada una de las preparaciones evaluadas. A pesar de las potencialidades farmacéuticas de estos compuestos no se han reportado ensayos clínicos en los que ellos estén implicados.

Compuestos orgánicos que actúan como metabolitos secundarios

Entre los compuestos aislados de cianobacterias que tienen actividad anticancerígena se encuentra las criptoficinas de *Nostoc sp.* Estos macrólidos han demostrado tener actividades citotóxicas por lo que han sido candidatos para quimioterapias por sus propiedades anti-proliferativas. Para el compuesto análogo criptoficina 52 (LY355703) se han realizado ensayos clínicos fase I y fase 2 en pacientes de cáncer que reciben quimioterapia³⁴. Estas sustancias químicas están formados por dos unidades de hidroxiaácidos y dos aminoácidas; adicionalmente en estas estructuras están contenidos dos núcleos aromáticos. También pueden estar presentes las funciones químicas epóxido (éter) y halógenos como sustituyentes (Fig. 6).

Fig. 5. Estructura general de los sulfoquinovosildiacilgliceroles (SQDGs) extraídos de cianobacterias del género *Scytonema*. La unidad básica está conformada por α-D-glucopiranosil, sustituido en el C-6 por un grupo sulfato. El anhidrido entre el azúcar y el glicerol ocurre por el carbono anomérico. Los grupos R/R' representan de forma general los grupos alquilo correspondientes a los ácidos grasos unidos al glicerol.

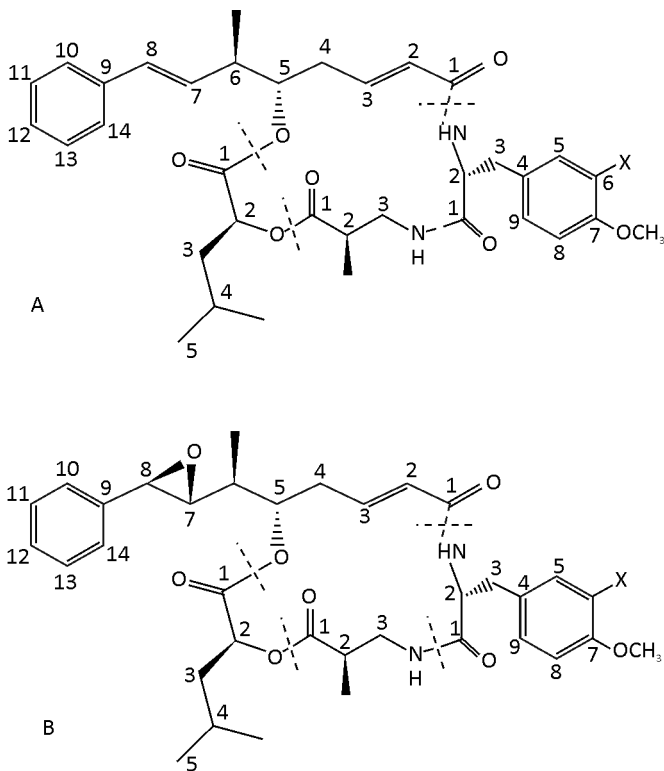


Fig. 6. Estructura general de las criptoficinas. Estos compuestos químicos están formados por dos hidroxiácidos y dos aminoácidos. Para la identificación de los carbonos estas moléculas se dividen en cuatro secciones (señaladas con líneas discontinuas). **A:** estructura general de las criptoficinas C y D. **B:** estructura general de las criptoficinas A y B. Para la criptoficina A y C, X = Cl. Para las criptoficina B y D, X = H.

También se ha identificado la curacina A en las preparaciones de *L. majuscula*³⁵, la que contiene una cadena hidrocarbonada que presenta múltiples insaturaciones, las funciones éter y alcohol, además de un heterociclo de cinco miembros que contiene azufre y nitrógeno, así como un ciclo de tres miembros altamente tensionado (Fig. 7). La curacina A o D han sido estructuras en las que la actividad fundamental adjudicada está relacionada con su acción antimitótica mediante la unión a estructuras como las tubulinas³⁵.

La dolastatina 10 extraída de *Symploca sp.* y la dolastatina 15 obtenida a partir de *Lyngbya sp.* (Fig. 8) son compuestos formados por residuos de aminoácidos y heterociclos que contienen azufre y nitrógeno que también han mostrado potencialidades para el tratamiento del cáncer³⁶. La somocistinamida A (*L. majuscula*/*Schizothrix sp./Assemblage*), una tetramida insaturada también ha demostrado ser un posible fármaco por propiedades anticancerígenas³⁷.

De acuerdo al sitio de registro de ensayos clínicos del NCBI³⁸, para la dolastatina 10 se han realizado alrededor de siete ensayos clínicos para el tratamiento de afecciones como cáncer pancreático, de hígado, próstata, leucemia, y sarcoma metastático recurrente. A pesar de las actividades biológicas demostradas en la dolastatina 10, existen diferentes estrategias que implican la obtención de otros derivados en los que se potencien estas propiedades citotóxicas³⁶.

En las microalgas también se han detectado otros compuestos que tienen propiedades como antibióticos. Entre ellos se encuentran la noscomina (Fig. 9), la cual es extraída de *Nostoc commune*. Este compuesto es un sistema formado por un núcleo de tres ciclohexanos en la misma disposición que se presentan en el hidrocarburo aromático fenantreno; adicionalmente contiene un grupo fenólico en el que también se encuentra un ácido carboxílico, los que están unidos al sistema tricíclico por un grupo metileno³⁷.

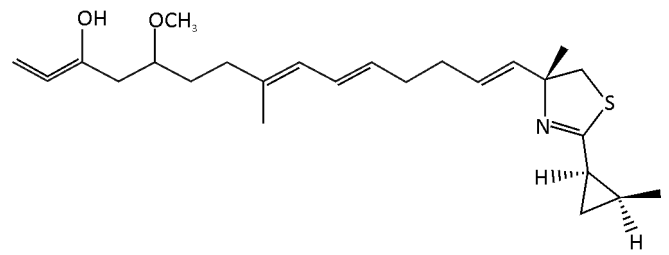


Fig. 7. Estructura de la curacina A extraída de la cianobacteria *L. majuscula*.

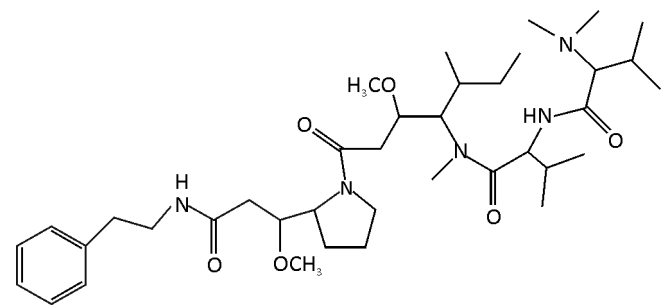


Fig. 8. Estructura general de las dolastatinas aisladas de microalgas.

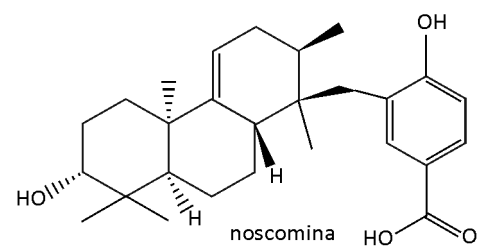


Fig. 9. Estructuras de compuestos que contienen el sistema del fenantreno, que poseen actividad bactericida.

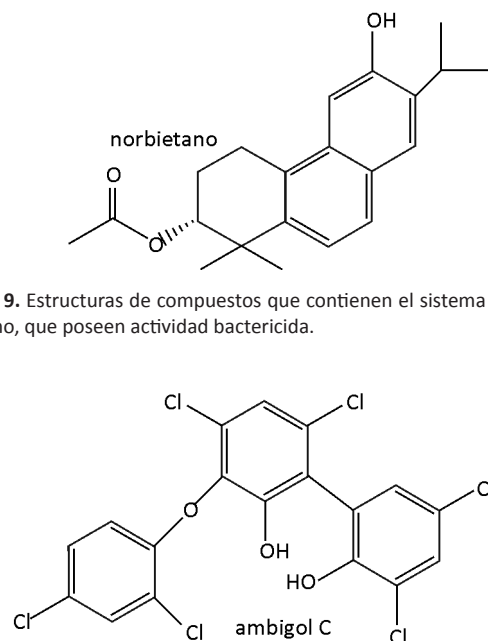


Fig. 10. El ambigol C es un compuesto aromático extraído de *Fischerella ambigua* para el cual se ha demostrado actividad bactericida.

El norbietano (diterpenoide, Fig. 9) extraído de *Microcoleus lacustris*³⁹ y el ambigol C (compuesto aromático policlorado, Fig. 10) de *Fischerella ambigua*⁴⁰ son otros productos naturales con usos potenciales como antibióticos.

Lípidos

Las cianobacterias y microalgas son organismos en los que también se han caracterizado elevadas cantidades de ácidos grasos poli-insaturados, fundamentalmente en las especies que se encuentran en zonas de temperaturas bajas⁴¹. En especial son de gran interés los ácidos grasos de cadena larga con insaturaciones en las posiciones omega-3 y omega-6, los que en *Enteromorpha spp.* pueden llegar a constituir hasta el 10,38 % del total de estas biomoléculas⁴². Entre los lípidos más representados se encuentran el β -caroteno (36-4500 mg/kg), la fucoxantina (hasta el 70 % del contenido total de carotenos) y el tocoferol.

Otros ácidos grasos identificados incluyen el ácido láurico (C12:0), ácido palmítico (C16:0), ácido linoléico (18:2n3), ácido oleico (18:1) y ácido esteárico (C18:0), los que tienen usos potenciales como antibióticos y como agentes antifúngicos⁴³. También se han podido extraer varios terpenos (algunos halogenados) con propiedades bactericidas, antioxidantes, antimaláricas, insecticidas y citotóxicas a partir del alga *Laurencia okamurai*⁴⁴.

Polifenoles

En varias especies de microalgas se han extraído compuestos polifenólicos, los que tienen propiedades antioxidantes, aunque el contenido de estos está relacionado con el método empleado para la extracción. También los compuestos fenólicos de *N. muscorum B.* tienen aplicaciones potenciales debido a sus propiedades como antibióticos⁴⁵.

Péptidos y proteínas

Las cianobacterias y microalgas contienen niveles elevados de proteínas entre las que se encuentran las que conforman los aparatos fotosintéticos de estos organismos⁶. Cada una de las ficobiliproteínas de los fotosistemas está conformada por una cadena polipeptídica y un grupo prostético. Para varias de estas ficobiliproteínas se han reportado propiedades antioxidantes, inmunomoduladoras, antivirales y neuroprotectoras, así como propiedades anticancerígenas asociadas a la inhibición de la proliferación celular y la inducción apoptótica³.

La aloficocianina (APC) (Fig. 11A) y C-ficocianina (CPC) (Fig. 11B) de varias algas verde-azules, contienen el pigmento ficocianobilina (PCB) (Fig. 13) en proporciones que son diferentes en cada caso. La APC contiene un grupo prostético por cada una de las cadenas que la conforman mientras que la CPC tiene unido un cromóforo en la cadena alfa y dos en la beta.

En estas ficobiliproteínas la PCB se encuentra unida mediante un enlace tioéter a cisteínas específicas de la secuencia aminoácida. La ubicación de forma general es en el contexto de una cavidad presente en la estructura de estas cadenas polipeptídicas (Fig. 11C).

En el contexto de los sistemas biológicos y de las preparaciones obtenidas de estas proteínas se debe tener en cuenta que las estructuras predominantes pudieran corresponder con especies agregadas. En el caso de la CPC el monómero formado por las dos cadenas que conforman esta proteína se pudieran encontrar también en forma de trímero, hexámero o dodecámero. La relación entre estas especies está directamente relacionada con la concentración de proteína en la preparación y con las condiciones del medio entre las que se pueden citar la temperatura, la fuerza iónica y el pH. Sin embargo las formas más representadas son la trimérica y hexamérica⁴⁶.

Debido a la naturaleza de la PCB se han adjudicado a este sistema tetrapirrólico varias de las propiedades biológicas encontradas en estas ficobiliproteínas, entre las que se pueden citar los efectos citoprotectores, inmunomoduladores y antioxidantes⁴⁷. Sin embargo existen también evidencias que las propiedades anticancerígenas, antioxidantes y apoptóticas pudieran estar relacionadas con las cadenas polipeptídicas⁴⁸.

La ficoeritrina es otro de los componentes de los fotosistemas que contiene el tetrapirrol eritrina, aunque también puede estar presente el grupo prostético ficourobilina (Fig. 12).

Las estructuras de estos dos pigmentos que contienen insaturaciones conjugadas también son semejantes a la PCB (Fig. 12C/D), por lo que sería posible que algunas de las propiedades de las ficobiliproteínas sean comunes debido a la semejanza existente en los grupos prostéticos.

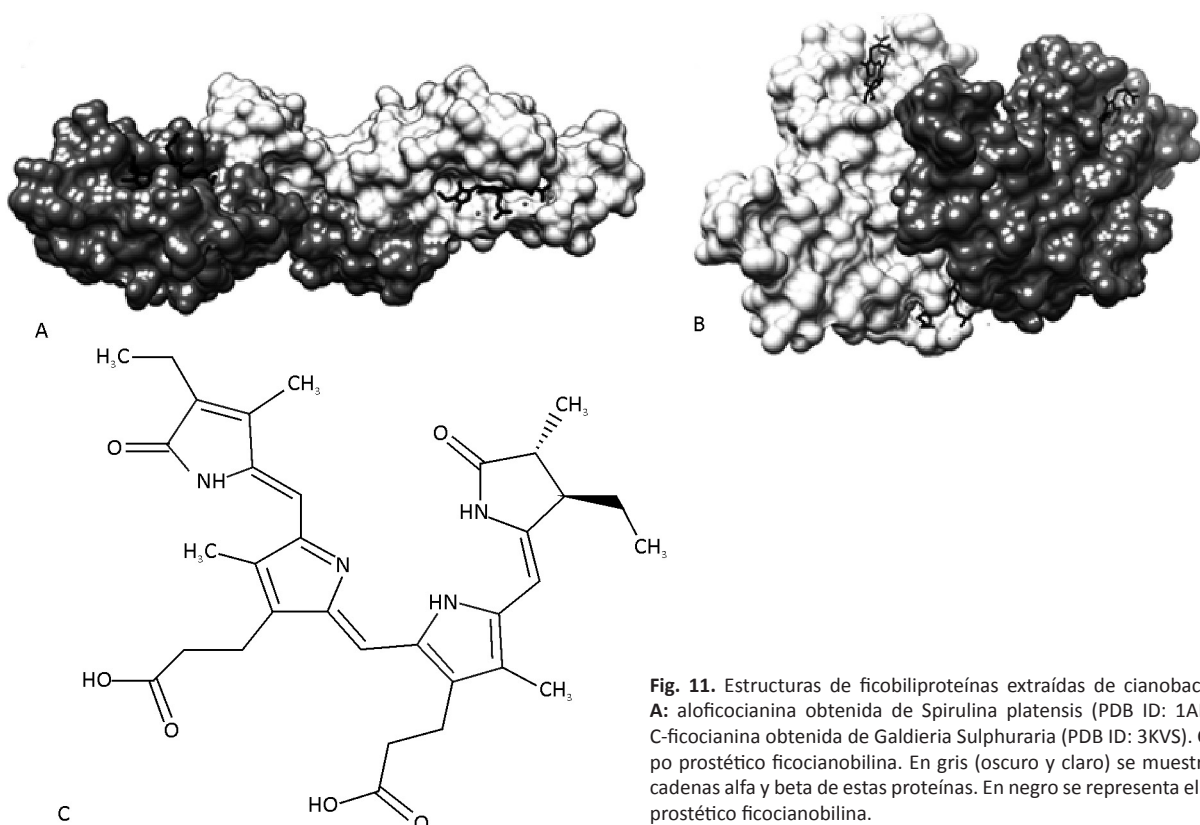


Fig. 11. Estructuras de ficobiliproteínas extraídas de cianobacterias. **A:** aloficocianina obtenida de *Spirulina platensis* (PDB ID: 1ALL). **B:** C-ficocianina obtenida de *Galdieria Sulphuraria* (PDB ID: 3KVS). **C:** grupo prostético ficocianobilina. En gris (oscuro y claro) se muestran las cadenas alfa y beta de estas proteínas. En negro se representa el grupo prostético ficocianobilina.

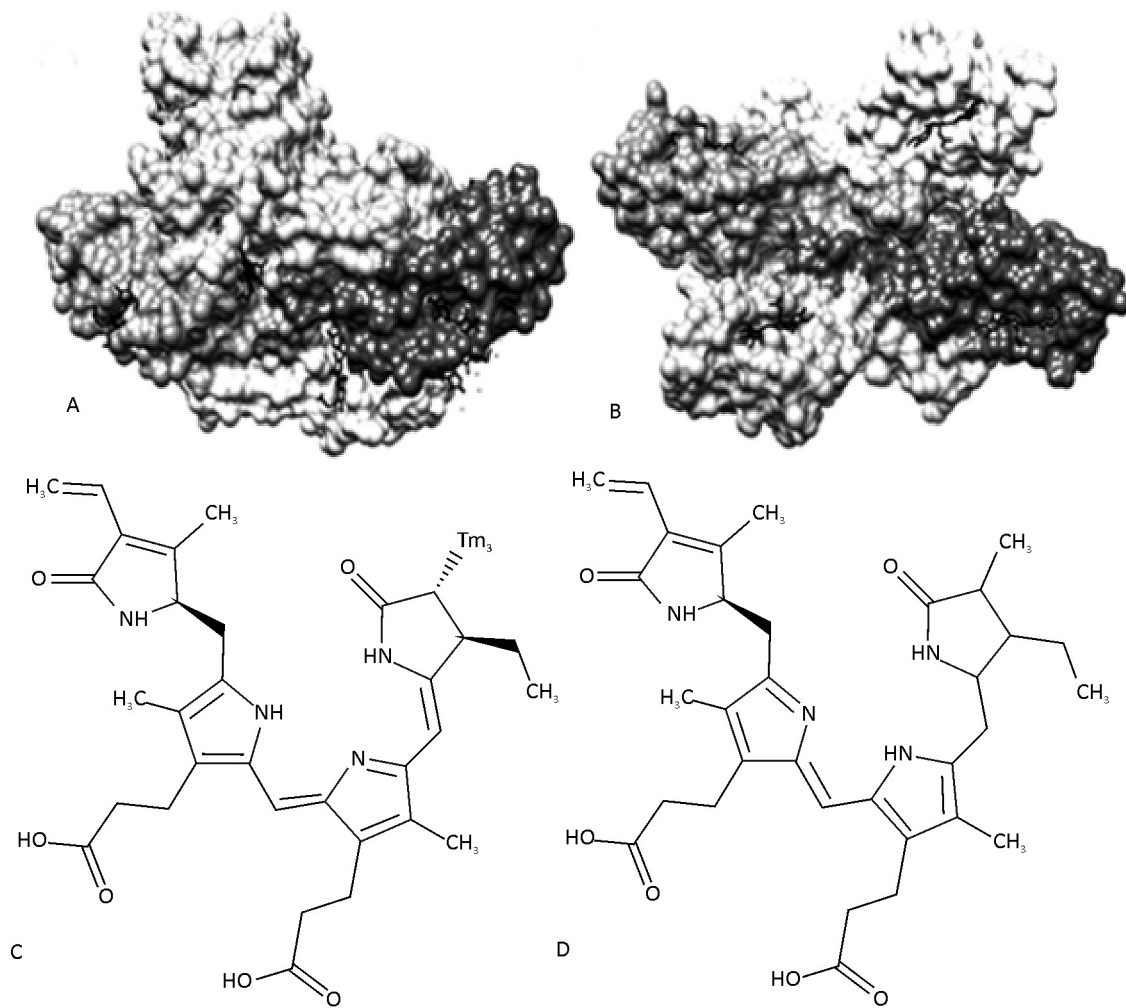


Fig. 12. Estructura de la Ficocitrina obtenida de *Gloeobacter violaceus* (PDB ID: 2VJH). Esta ficobiliproteína está conformada por cuatro cadenas polipeptídicas. En negro se representa el grupo prostético ficocitrobilina y en gris ficourobilina. **A:** panel frontal y **B:** panel posterior de la estructura de la ficobiliproteína. **C:** estructura de la ficocitrina y **D:** estructura de la ficourobilina.

La ficocitrocianina es también otro de los componentes de los ficobilisomas². La estructura está formada por dos cadenas polipeptídicas que tienen unidos grupos prostéticos que contienen insaturaciones conjugadas (Fig. 13).

La cianovirina-N (Fig. 14A) extraída de *N. ellipso sporum*, tiene actividad antiviral contra HIV-1, HIV-2, HSV-6, Mesles, SIV y FIV. Otro compuesto con propiedades antivirales contra HIV-1 es la escitovirina N, compuesto químico que es aislado de *Scytonema varium*. Esta estructura presenta determinadas semejanzas con la cianovirina-N, pero de forma general los elementos de estructura secundaria (hoja beta) están menos representados en la escitovirina N (Fig. 14B). También se han identificado varios inhibidores de proteasas como la quimotripsina, tripsina, elastasa. Entre estos moduladores de la actividad proteolítica se pueden citar a Cianopeptolina 963 A (*Microcystis*), Cianopeptolina 954 (*Microcystis aeruginosa*), Lingbiastatina 5-7 (*Lyngbya sp.*), Lingbiastatina 4 (*Lyngbya confervoides*), Simplocamida A (*Symploca sp.*) y Planktociclina (*Planktothrix rubescens*)³⁷.

La inhibición por Lingbiastatina 7 de la elastasa porcina presumiblemente está asociada a un mecanismo que no implica el centro activo de la enzima, ya que la unión del inhibidor ocurre en una región que se encuentra en una posición contraria a los grupos de la enzima involucrados en la acción catalítica (Fig. 15).

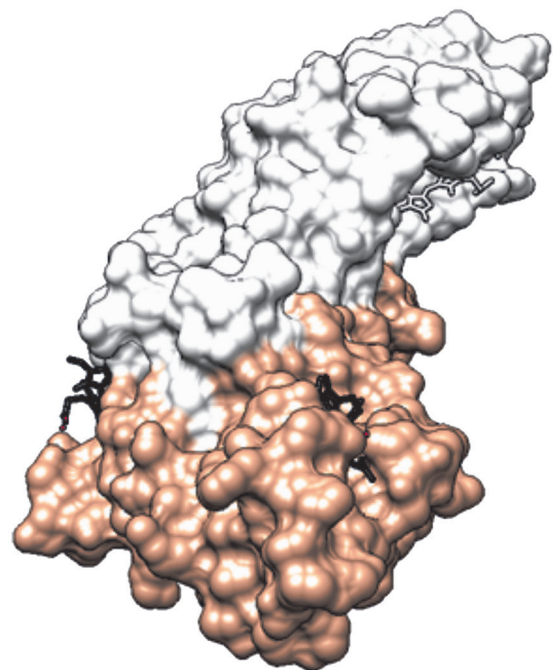


Fig. 13. Estructura de la Ficocitrocianina obtenida de *Mastigocladus laminosus* (PDB ID: 2C7K). Esta ficobiliproteína está conformada por dos cadenas polipeptídicas (presentadas en gris y blanco). En negro se representa el grupo prostético ficocianobilina y en gris Biliverdina IX alfa.

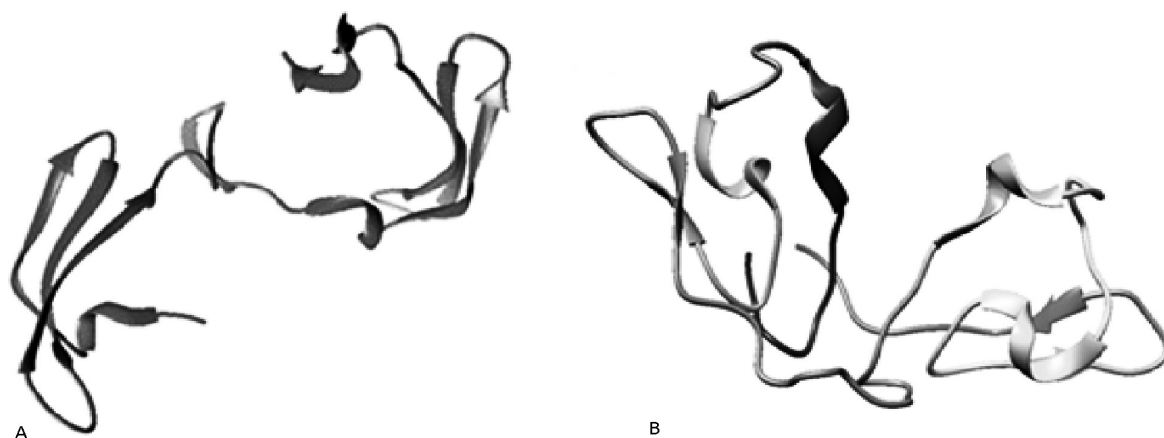


Fig. 14. Estructura polipéptidos con actividad contra el HIV-1: **A:** cianovirina-N (PDB ID: 4J4C). **B:** escitovirina N (PDB ID: 2QT4). Estas estructuras están formadas fundamentalmente por hojas beta conectadas por giros.

Pigmentos de naturaleza no proteica

Estos compuestos se pueden dividir en dos grupos fundamentales: (1) clorofilas y (2) carotenoides⁴⁹. Las clorofilas son sustancias químicas de color verde que se pueden encontrar en varias especies de cianobacterias, así como en los cloroplastos de algas y plantas. Están formadas por un sistema tetrapirrólico en el que se identifican insaturaciones conjugadas. Este sistema puede complejar un metal como los iones magnesio. También aparecen otros grupos funcionales como pueden ser los ésteres de ácidos carboxílicos (Fig. 16A). Aunque una de las formas más comunes de la clorofila es la Clorofila a también se pueden encontrar otras variantes estructurales como la Clorofila b, Clorofila c1, Clorofila c2, Clorofila d y Clorofila f. Los carotenoides son compuestos orgánicos hidrofóbicos e insaturados que se encuentran fundamentalmente en los cloroplastos y los cromoplastos de las microalgas. Estas sustancias tienen propiedades oxidantes, que dependen de su estructura así como de la fuente de donde son extraídos⁵⁰. Estos lípidos son estructuras del tipo tetraterpenoide, con una disposición del esqueleto hidrocarbonado semejante a la encontrada en el alfa-caroteno (Fig. 16B).

En conclusión, las microalgas y cianobacterias son sistemas biológicos en los que se pueden caracterizar productos con actividades biológicas que los hacen candidatos terapéuticos para el tratamiento de diferentes enfermedades asociadas a procesos infecciosos, inmunes, etc. Por otra parte son fuentes de sustancias con elevado valor en otras industrias entre la que se incluye la alimenticia, debido a los valores nutricionales de los componentes que se encuentran en estos sistemas biológicos, los que pueden variar en función de la especie de la microalga, así como de la

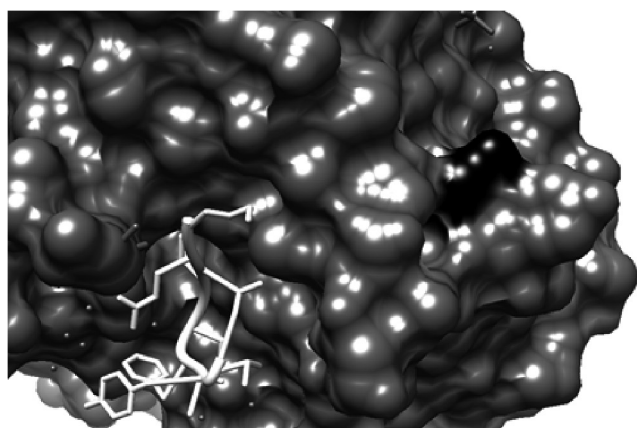


Fig. 15. Estructura de la Lingbiastatina 7 en complejo con la elastasa pancreática porcina (PDB ID: 4GVU). La estructura del inhibidor se muestra en color blanco y parte de la región correspondiente al centro activo de la enzima se presenta en color negro.

localización y las condiciones en las que se desarrollan estos microorganismos. Debido a las potencialidades de estos productos para varios de ellos se han realizado ensayos en líneas celulares, en modelos animales e incluso ensayos clínicos. Sin embargo los estudios realizados con algunas de estas sustancias extraídas de estas fuentes naturales deben seguir su desarrollo hasta la obtención de un producto que pueda ser comercializado.

Referencias bibliográficas

- Colla, L. M., Oliveira Reinehr, C., Reichert, C. & Costa, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresour. Technol.* 98, 1489–1493 (2007).
- Sekar, S. & Chandramohan, M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *J. Appl. Phycol.* 20, 113–136 (2008).
- Singh, R. K., Tiwari, S. P., Rai, A. K. & Mohapatra, T. M. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 64, 401–412 (2011).
- Spolaore, P. & Joannis-Cassan, C. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci.* ... 101, 87–96 (2006).
- Volk, R.-B. & Furkert, F. H. Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. *Microbiol. Res.* 161, 180–186 (2006).
- Babadzhanov, a. S. et al. Chemical Composition of *Spirulina platensis* Cultivated in Uzbekistan. *Chem. Nat. Compd.* 40, 276–279 (2004).
- Rohani-Ghadikolaei, K., Abdullalian, E. & Ng, W.-K. Evaluation of the proximate, fatty acid and mineral composition of representative green, brown and red seaweeds from the Persian Gulf of Iran as potential food and feed resources. *J. Food Sci. Technol.* 49, 774–80 (2012).
- Chojnacka, K. Biologically Active Compounds in Seaweed Extracts - the Prospects for the Application. *Open Conf. Proc. J.* 3, 20–28 (2012).
- Chem Draw. No Title. at <www.cambridgesoft.com/software/Chem-Draw/>
- Pettersen, E. F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–12 (2004).
- Leonard, S. G. et al. The effects of supplementing the diet of the sow with seaweed extracts and fish oil on aspects of gastrointestinal health and performance of the weaned piglet. *Livest. Sci.* 134, 135–138 (2010).
- Ghosh, T. et al. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure-activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology* 19, 2–15 (2008).
- Vidanarachchi, J. K., Iji, P. A., Mikkelsen, L. L., Sims, I. & Choct, M. Isolation and characterization of water-soluble prebiotic compounds from Australian and New Zealand plants. *Carbohydr. Polym.* 77, 670–676 (2009).
- Ferreira, L. G. et al. Chemical structure of the complex pyruvylated and sulfated agar from the red seaweed *Palisada flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta). *Carbohydr. Res.* 347, 83–94 (2012).
- Fitton, J. H., Stringer, D. N. & Karpiniec, S. S. Therapies from Fucoidean: An Update. *Mar. Drugs* 13, 5920–46 (2015).

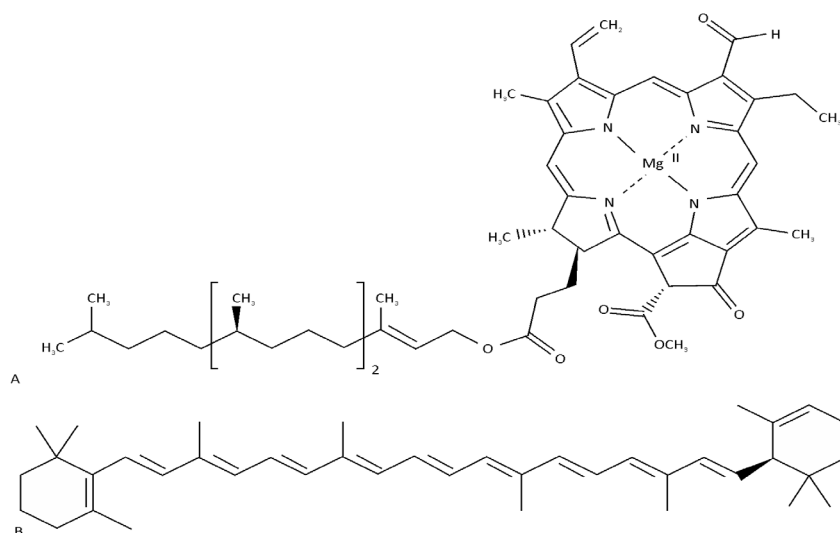


Fig. 16. Estructuras de los pigmentos no proteicos encontrados en algunas cianobacterias. A: representación de la estructura química de la clorofila A. B: estructura del alfa-caroteno.

16. Ustyuzhanina, N. E. et al. Fucoidans: pro- or antiangiogenic agents? *Glycobiology* 24, 1265–74 (2014).
17. Wang, W., Wang, S.-X. & Guan, H.-S. The antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides: an overview. *Mar. Drugs* 10, 2795–816 (2012).
18. Irhimeh, M. R., Fitton, J. H. & Lowenthal, R. M. Pilot clinical study to evaluate the anticoagulant activity of fucoidan. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 20, 607–10 (2009).
19. Irhimeh, M. R., Fitton, J. H. & Lowenthal, R. M. Fucoidan ingestion increases the expression of CXCR4 on human CD34+ cells. *Exp. Hematol.* 35, 989–94 (2007).
20. Hernández-Corona, D. M., Martínez-Abundis, E. & González-Ortiz, M. Effect of fucoidan administration on insulin secretion and insulin resistance in overweight or obese adults. *J. Med. Food* 17, 830–2 (2014).
21. Jiao, G., Yu, G., Zhang, J. & Ewart, H. S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar. Drugs* 9, 196–233 (2011).
22. Rocha, H. a O. et al. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spaghtoglossum schroederi*: An ideal antithrombotic agent? *J. Biol. Chem.* 280, 41278–41288 (2005).
23. Synytsya, A. et al. Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*. *Carbohydr. Polym.* 81, 41–48 (2010).
24. Ahmadi, A., Zorofchian Moghadamtousi, S., Abubakar, S. & Zandi, K. Antiviral Potential of Algae Polysaccharides Isolated from Marine Sources: A Review. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–10 (2015).
25. Kadam, S. U., Tiwari, B. K. & O'Donnell, C. P. Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae. *Int. J. Food Sci. Technol.* 50, 24–31 (2015).
26. Kadam, S. U., Tiwari, B. K. & O'Donnell, C. P. Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae. *Int. J. Food Sci. Technol.* 50, 24–31 (2015).
27. Rioux, L.-E., Turgeon, S. L. & Beaulieu, M. Structural characterization of laminaran and galactofucan extracted from the brown seaweed *Saccharina longicuris*. *Phytochemistry* 71, 1586–95 (2010).
28. Choi, J., Kim, H.-J. & Lee, J.-W. Structural feature and antioxidant activity of low molecular weight laminarin degraded by gamma irradiation. *Food Chem.* 129, 520–523 (2011).
29. Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Alginates: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 37, 106–126 (2012).
30. Aliste, A. J., Vieira, F. F. & Del Mastro, N. L. Radiation effects on agar, alginates and carrageenan to be used as food additives. *Radiat. Phys. Chem.* 57, 305–308 (2000).
31. LEE, J.-B. et al. Effects of Structural Modification of Calcium Spirulan, a Sulfated Polysaccharide from *Spirulina Platensis*, on Antiviral Activity. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 49, 108–110 (2001).
32. Kanekiyo, K. et al. Isolation of an antiviral polysaccharide, nostoflan, from a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme*. *J. Nat. Prod.* 68, 1037–41 (2005).
33. Tsai, C.-J. & Sun Pan, B. Identification of sulfoglycolipid bioactivities and characteristic fatty acids of marine macroalgae. *J. Agric. Food Chem.* 60, 8404–10 (2012).
34. D'Agostino, G. et al. A multicenter phase II study of the cryptophycin analog LY355703 in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 16, 71–6
35. Wipf, P., Reeves, J. T. & Day, B. W. Chemistry and biology of curacin A. *Curr. Pharm. Des.* 10, 1417–37 (2004).
36. Maderna, A. et al. Discovery of cytotoxic dolastatin 10 analogues with N-terminal modifications. *J. Med. Chem.* 57, 10527–43 (2014).
37. Singh, S., Kate, B. N. & Banerjee, U. C. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25, 73–95 (2005).
38. Ensayos Clínicos del NCBI. at <<https://clinicaltrials.gov>>
39. Bui, H. T. N., Jansen, R., Pham, H. T. L. & Mundt, S. Carbamidocyclophanes A-E, chlorinated paracyclophanes with cytotoxic and antibiotic activity from the Vietnamese cyanobacterium *Nostoc* sp. *J. Nat. Prod.* 70, 499–503 (2007).
40. Lal, P. et al. Biofilm formation by *Candida albicans* isolated from intrauterine devices. *Indian J. Microbiol.* 48, 438–44 (2008).
41. Holdt, S. L. & Kraan, S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* 23, 543–597 (2011).
42. Aguilera-Morales, M., Casas-Valdez, M., Carrillo-Domínguez, S., González-Acosta, B. & Pérez-Gil, F. Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha* spp. as a potential food source. *J. Food Compos. Anal.* 18, 79–88 (2005).
43. Bhagavathy, S., Sumathi, P. & Jancy Sherene Bell, I. Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 1, S1–S7 (2011).
44. MAO, S.-C. & GUO, Y.-W. Sesquiterpenes from Chinese Red Alga *Laurencia okamurai*. *Chin. J. Nat. Med.* 8, 321–325 (2010).
45. El-Sheekh, M. M., Osman, M. E. H., Dyab, M. A. & Amer, M. S. Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 42–50 (2006).
46. MacColl, R., Lee, J. J. & Berns, D. S. Protein aggregation in C-phycoyanin. Studies at very low concentrations with the photoelectric scanner of the ultracentrifuge. *Biochem. J.* 122, 421–6 (1971).
47. Marín-Prida, J. et al. Phycocyanobilin promotes PC12 cell survival and modulates immune and inflammatory genes and oxidative stress markers in acute cerebral hypoperfusion in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 49–60 (2013).
48. Wang, H., Liu, Y., Gao, X., Carter, C. L. & Liu, Z.-R. The recombinant beta subunit of C-phycoyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. *Cancer Lett.* 247, 150–8 (2007).
49. Chojnacka, K. Biologically Active Compounds in Seaweed Extracts - the Prospects for the Application. *Open Conf. Proc. J.* 3, 20–28 (2012).
50. Li, Y.-X. & Kim, S.-K. Utilization of seaweed derived ingredients as potential antioxidants and functional ingredients in the food industry: An overview. *Food Sci. Biotechnol.* 20, 1461–1466 (2011).

Recibido: 20 de diciembre de 2015.

Aprobado: 17 de febrero de 2016.

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS E INGENIERÍA

**YACHAY
TECH** 

Yachay Tech es la primera universidad de investigación interdisciplinaria en Ecuador. Su objetivo es convertir a la región Andina en un centro que forme ciudadanos que contribuyan a la tecnología, la economía, la cultura y el espíritu empresarial del mundo.

La Universidad está en búsqueda de investigadores Ph.Ds que deseen unirse al cuerpo docente de su Escuela de Ciencias Biológicas e Ingeniería y que deseen aportar activamente al desarrollo de la institución.

La escuela está liderada por el decano Spiros Agathos, PhD., cuenta con su propio Jardín Botánico para investigación, laboratorios de última tecnología y un importante equipo de trabajo que permite ampliar las conexiones de colaboración para la implementación de grandes proyectos.

Contacto de aplicaciones:
Spiros Agathos, Ph.D
sagathos@yachaytech.edu.ec




**ESCUELA DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS
E INGENIERÍA**




www.yachaytech.edu.ec


**YACHAY
TECH** 

UNIVERSIDAD
DE INVESTIGACIÓN
DE TECNOLOGÍA
EXPERIMENTAL

 /YachayTech

 @YachayTech

 /YachayTech

 /YachayTech

REVISIÓN / REVIEW

Mecanismos de invasión del esporozoíto y merozoíto de *Plasmodium*

Mechanisms of invasion from sporozoite and merozoíto of *Plasmodium*

Lilian M. Spencer^{1,2}, Andreina Gómez³, Eva Collovini⁴

DOI. 10.21931/RB/2016.01.02.9

RESUMEN

La malaria o paludismo en el humano es causada por cinco especies de *Plasmodium* pertenecientes al phylum Apicomplexa; *knowlesi*, *ovale*, *malariae*, *vivax* y *falciparum*, siendo esta última la responsable de las complicaciones clínicas más graves e incluso la muerte del hospedador vertebrado. El parásito *Plasmodium* posee organelos secretores especializados llamados roptrias, micronemas y gránulos densos, los cuales facilitan la invasión a las células hospedadoras. El estadio de esporozoíto del *Plasmodium* migra y penetra a través de diferentes células en el hospedador vertebrado hasta llegar al hepatocito y formar la vacuola parasitófora; la ruptura del hepatocito libera otro estadio del parásito llamado merozoíto, el cual invade a los eritrocitos y también forma una vacuola parasitófora. Los investigadores proponen varios mecanismos de invasión como el movimiento de deslizamiento del esporozoíto (Gliding motility en Inglés), mientras que la invasión del merozoíto se realiza en tres pasos: contacto inicial, re-orientación e invasión. En esta revisión nos enfocamos en las proteínas de superficie tanto del esporozoíto como del merozoíto para el entendimiento de los mecanismos moleculares de la invasión hasta la elaboración de la vacuola parasitófora. Se hace referencia a las proteínas más importantes que intervienen en estos mecanismos y son posibles candidatas en el diseño de una vacuna anti-malárica.

Palabras clave: malaria, invasión, esporozoíto, merozoíto, *Plasmodium*.

ABSTRACT

Malaria or paludismo is caused in humans by five species of *Plasmodium* belonging to phylum Apicomplexa: *knowlesi*, *ovale*, *malariae*, *vivax* and *falciparum*, being the last, the responsible of the clinical complication and death in the vertebrate host. *Plasmodium* parasite possess a specialized secretory organelles called roptries, micronemes and dense granules that facilitate invasion of host cells. The sporozoite stage of *Plasmodium* travels through the different cells of vertebrate host until it reaches the hepatocyte and have been form the parasitophorous vacuole. The infected hepatocytes rupture, results in the releasing thousands of daughter merozoites that invade the erythrocytes with the formation of parasitophorous vacuole too. Several researchers suggest the gliding motility mechanism as the responsible of hepatocyte invasion. While, which the erythrocyte invasion process has been described as the result of tree steps: first contact, re-orientation and invasion. In this review the surface proteins of merozoites and esporozoites are pointed out as the most important factors for the molecular invasion mechanisms until the elaboration of the parasitophorous vacuole. These proteins that take part in these mechanisms are the possible candidates in the design of an anti-malaria vaccine.

Keywords: malaria, invasion, esporozoíto, merozoíto, *Plasmodium*.

Introducción

La malaria o paludismo es causada por el parásito protozoario del género *Plasmodium*, perteneciente al phylum Apicomplexa. Existen cinco especies que infectan al humano (hospedador vertebrado): *ovale*, *malariae*, *vivax*, *falciparum* y *knowlesi*. Esta última se reportó como una zoonosis de primates a humanos en regiones africanas¹. La especie *falciparum* es la más agresiva en relación a las manifestaciones clíni-

cas, y es responsable de la mayoría de las muertes en el hospedador humano. La Organización Mundial de la Salud en el 2011 reporto cerca de 216 millones de personas infectadas de malaria y aproximadamente 655.000 muertes. Se estima que la mitad de la población mundial está en riesgo de contraer la enfermedad, por lo que es una prioridad desarrollar estrategias para el diseño de una vacuna efectiva¹. El parásito ha desarrollado una compleja estrategia para adaptarse a sus hospedadores y evadir el sistema inmune. Uno de los mecanismos recientemente descritos es la formación

¹Departamento de Ciencias de la Vida y Biotecnología. Universidad Yachay Tech, Imbabura, Ecuador.

²Universidad de Venezuela. Departamento de Biología Celular de la Universidad Simón Bolívar, Caracas-Venezuela.

³Universidad de Granada, España.

⁴Universidad Nacional Experimental Rómulo Gallego, Escuela Veterinaria, núcleo Zaraza, Venezuela.

Correspondencia: Lilian M. Spencer. Profesora del Departamento de Ciencias de la Vida y Biotecnología en Yachay Tech. E-mail: spencerlilian@gmail.com; lspencer@yachaytech.edu.ec

del merozooma, proceso por el cual, los merozoítos que salen del hígado, evaden el sistema inmune por estar dentro de una vesícula (merosoma) que se libera en los vasos sanguíneos del hígado (sinusoides) antes de invadir a los eritrocitos².

Este parásito presenta un ciclo de vida muy complejo (Fig. 1). Los parásitos son transmitidos por un vector, la hembra del mosquito *Anopheles*, que es portador del parásito al alimentarse de la sangre de un vertebrado infectado. En el tubo digestivo del mosquito se lleva a cabo el ciclo sexual del parásito con la fecundación de los macro y micro gametos, y posteriormente se desarrolla el cigoto motil llamado ookinete. Una división asexual da origen al esporozoíto, que es el estadio infectante del vertebrado. Cuando los esporozoítos que están en las glándulas salivares del vector son inyectados dentro del hospedador vertebrado, son transportados rápidamente al hígado donde invaden a los hepatocitos³, en los cuales ocurre una división asexual llamada esquizogonia hepática o ciclo extra-eritrocítico que da origen al estadio llamado merozoíto. Este proceso de invasión del esporozoíto ha sido extensivamente estudiado por varios investigadores⁴⁻⁷, aunque poco se sabe del desarrollo y liberación del merozoíto proveniente de las células hepáticas. En *P. vivax* se ha descrito otro estadio adicional llamado hipnozoíto, el cual queda latente en los hepatocitos y puede activar la infección en un periodo relativamente corto entre 10 a 30 semanas, siendo responsable de las recidivas de la enfermedad⁸.

El merozoíto es liberado al torrente sanguíneo con consiguiente invasión de los eritrocitos en los cuales ocurre otra división asexual, llamada esquizogonia eritrocítica. El merozoíto

comienza la invasión al eritrocito del cual se liberan más de 32 nuevos merozoítos en aproximadamente 48 horas, provenientes de un esquizonte maduro. Este esquizonte maduro estalla, liberando y dispersando los nuevos merozoítos que re-invaden nuevos eritrocitos. También, a partir del esquizonte maduro, se liberan al torrente sanguíneo los gametocitos, los cuales son ingeridos por el mosquito vector al picar al hospedador infectado y de esta forma se cierra el ciclo del parásito. En los procesos de invasión del esporozoíto y merozoíto están involucradas numerosas proteínas y solo en el merozoíto de *P. falciparum* se reportan más de 40⁹. Estas proteínas no solo se encuentran distribuidas en la superficie de los diferentes estadios del parásito; sino también son secretadas por organelos especializados como micronemas, roptrias y gránulos densos que conforman parte del complejo apical y donde se presentan muchas de las proteínas necesarias para el proceso de invasión y el establecimiento de la vacuola parasitófora (VP) dentro de las células del hospedador¹⁰⁻¹².

Se ha reportado un patrón de organización en las organelas que constituyen el complejo apical, el cual es muy similar tanto en el esporozoíto como en merozoíto (Fig. 2)^{13,14}.

En este trabajo se hará hincapié en las proteínas más relevantes implicadas en los mecanismos de invasión, tanto las del esporozoíto como del merozoíto de *P. falciparum*. En el primer caso las más importantes son: la Proteína Anónima Relacionada con la Trombospondina (TRAP, del inglés thrombospondin-related anonymous protein), y la Proteína Circumsporozoítica (CSP, del inglés circumsporozoite protein); y en el merozoíto: el Antígeno de Membrana Apical 1 (AMA 1, del inglés apical membrane antigen 1), la Proteína de Superficie del Merozoíto 1 (MSP 1, del inglés

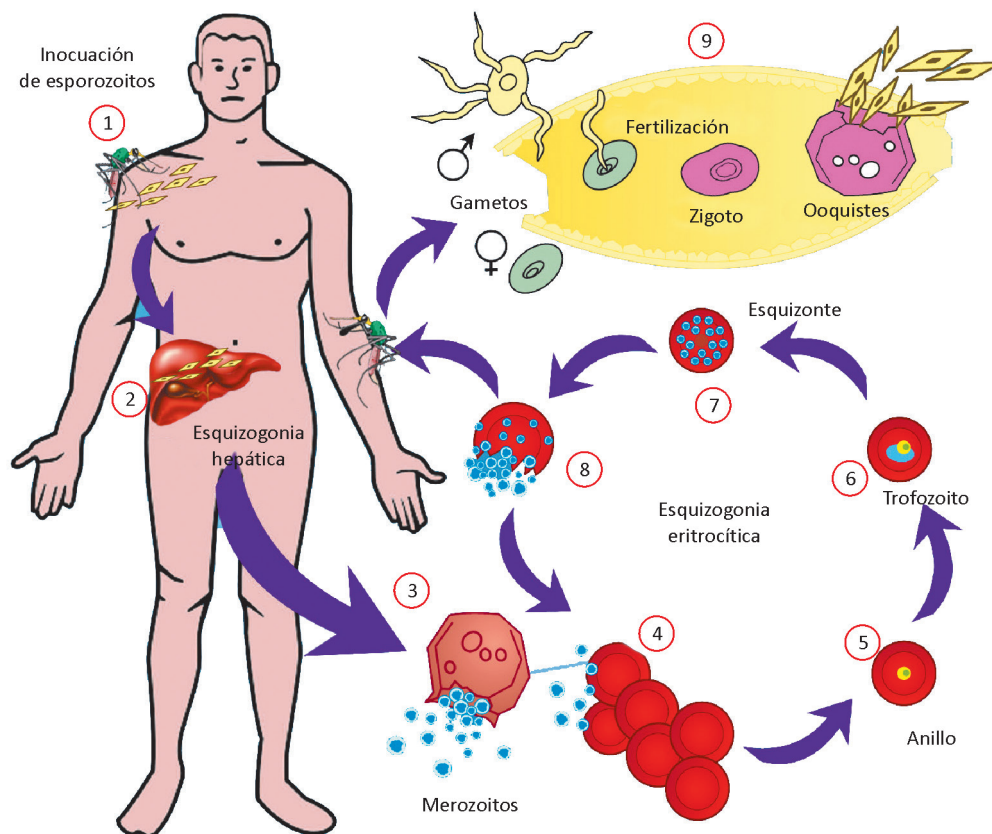


Fig. 1. Ciclo de vida de Plasmodium.

Los esporozoítos son inoculados por la hembra del mosquito *Anopheles*, (1) y viajan por el torrente sanguíneo hasta invadir a los hepatocitos (2). Aproximadamente a la semana, el parásito se ha multiplicado intracelularmente (esquizogonia hepática) y se liberan los merozoítos de los infectados hepatocitos para invadir a los eritrocitos (3). El merozoíto invade al eritrocito donde se multiplica en su interior (4) (esquizogonia eritrocítica), pasando por diferentes formas llamadas: anillo (5), trofozoito (6), esquizonte inmaduro (7) y esquizonte maduro (8). Este ciclo eritrocítico dura 48 horas liberándose al torrente sanguíneo de 16 a 32 nuevos merozoítos dependiendo de la especie. Los gametocitos se desarrollan dentro de los eritrocitos y junto con los merozoítos son liberados y estos son ingeridos por el mosquito donde ocurre la fertilización en el tubo digestivo del mismo con formación del cigoto (9). Este se divide formando un ooquiste, de donde se liberan los esporozoítos que invaden las glándulas salivares del vector.

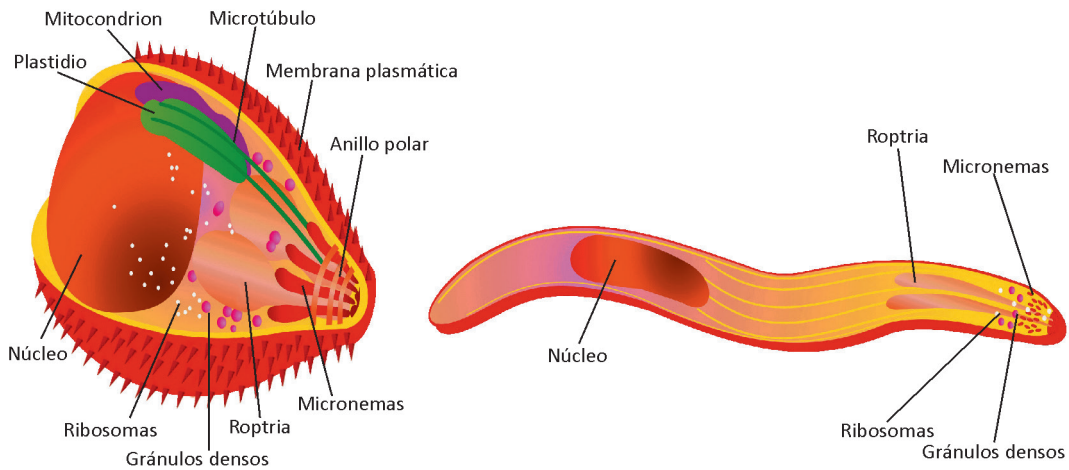


Fig. 2. Estructuras del complejo apical del esporozoito y merozoito.

Esquema de los dos estadios de *P.falciparum*, que se encuentran en el humano. Se señalan las organelas conservadas en los estadios del esporozoito (derecha) y merozoito (izquierda), las cuales son esenciales en la invasión a las células hospedadoras por presentar un complejo apical formado por: roptimias, micronemas y gránulos densos.

merozoite surface protein 1) conocida también como el Antígeno de Superficie del Merozoito 1 (MSA 1, del inglés merozoite surface antigen 1), y el Antígeno Unido al Eritrocito (EBA, del inglés erythrocyte binding antigen). Otras proteínas son representadas por la familia de Proteínas Roptimias (RAP, del inglés roptrias antigen protein), el Antígeno de Superficie del Eritrocito en Anillo Infectado (RESA, del inglés ring-infected erythrocyte surface antigen), el Antígeno de Membrana del Anillo (RIMA, del inglés ring membrane antigen) y dos proteasas parecidas a Subtilisina (SUB-1 y SUB-2, del inglés subtilisin-like proteases), siendo estas las más relevantes en la invasión y en el diseño de vacunas¹⁵.

Todas estas proteínas juegan un papel esencial para entender los mecanismos de invasión del parásito en las células del hospedador, y están involucradas tanto en el movimiento de desplazamiento del esporozoito, como en la rápida penetración del merozoito y en la interacción receptores-ligandos en la superficie del parásito hasta la formación de la VP.

Proteínas implicadas en el reconocimiento e invasión del hepatocito por el esporozoito

El esporozoito es el estadio con mejor adaptación ya que se puede encontrar en diferentes hospedadores y tipos de células. El esporozoito de *Plasmodium* es móvil y presenta un movimiento característico en espiral descrito por varios investigadores llamado "Deslizamiento" (gliding motility en inglés). Este movimiento requiere de microfilamentos y es esencial para la invasión¹⁶.

En este proceso de invasión, la proteína CSP es esencial y se encuentra en mayor proporción en la superficie del parásito por medio de un anclaje tipo glicosil fosfatidil inositol (GPI, del inglés glycosyl phosphatidyl inositol) a la membrana del esporozoito. Esta CSP es expresada desde el estadio de ooquiste dentro del vector y presenta una secuencia repetida de amino ácidos (NANP), que fue usada en el primer ensayo de vacuna para malaria^{17,18}. Varios investigadores han demostrado que la CSP está presente en el citosol de los hepatocitos cuando se incuban con esporozoitos.⁴ Esta proteína contiene una copia de la proteína trombospondina (TSP) tipo I de humano y es translocada a la superficie por un proceso dependiente de actina¹⁶.

El parásito en las glándulas salivares del vector inicia la expresión de las proteínas TRAP y CSP. La TRAP se localiza en los micronemas y es secretada sobre la superficie del parásito. Esta proteína contiene una estructura con una secuencia señal de amino ácidos hidrofóbica la cual ha sido encontrada en algunas integrinas (región II), es rica en prolina y presenta una cola hidro-

fílica citoplasmática¹⁹. Experimentos de inmunofluorescencia con anticuerpos han demostrado que en el momento de la invasión hay una relocalización de la proteína TRAP sobre el parásito concentrándose en un extremo en forma de capuchón²⁰. Sin embargo, TRAP parece no ser determinante en la invasión y presenta una función primordial en el proceso de adhesión ya que reconoce a la molécula de heparin sulfato (HS) de los hepatocitos. La CSP como la TRAP, reconoce diferentes tipos específicos de proteoglicanos (HSPG, del inglés highly sulfated heparin sulfate proteoglycans) en la superficie celular de las células de Kupffer, células estrelladas y hepatocitos; pero no del endotelio sinusoidal²¹.

Noe y Adams²², demostraron por confocalidad que la proteína de Membrana Apical Antígeno/Unida al Eritrocito (MAEBL, del inglés apical membrane antigen/erythrocyte binding-like protein), localizada en las roptimias, se expresa junto con las proteínas roptimias 1 y 2 (RAP 1 y RAP 2, del inglés roptry associated protein 1 and 2) involucradas en el proceso de invasión. Esta proteína es expresada relativamente temprano en el desarrollo del esquizonte, apareciendo sobre la superficie del merozoito; su función todavía no ha sido aclarada.

Cuando el esporozoito entra al torrente sanguíneo es capaz de penetrar en el hepatocito induciendo la invaginación de la membrana plasmática (MP) y la formación de la VP para multiplicarse en el interior de la célula del hospedador.

La pregunta lógica que se hicieron los investigadores que estudian los mecanismos de invasión del esporozoito después de dilucidar los procesos de adhesión entre las células parásito-hospedador, fue: ¿cómo migra el esporozoito desde el vaso sinusoidal al hepatocito?

Se sabe que existe un marcado tropismo entre el esporozoito y el hepatocito que está cubierto por HSPGs del tipo HS, los cuales son abundantes en la matriz extracelular de los hepatocitos y estos a la vez tienen interacción con la CSP^{23,24}. La CSP también reconoce a las HSPGs de las células de Kupffer y estrelladas que están en el espacio de Disse. Uno de los modelos planteados es que el esporozoito es arrastrado desde el vaso sanguíneo sinusoidal hacia la matriz extracelular y a las células de Kupffer, residentes de los vasos sinusoides, por la unión establecida con los HSPGs y de esa forma atraviesa la barrera de la célula sinusoidal^{25,26}. Pradel y Frevert en el 2001²⁵, demostraron que el esporozoito pasa primero por la célula de Kupffer y luego al hepatocito, lo que sugiere que la célula de Kupffer presenta actividad fagocítica actuando como un transportador del esporozoito.

Pradel y colaboradores²¹, proponen otro modelo para explicar la invasión del hepatocito por el esporozoito, sugiriendo que

los esporozoítos se unen a los HPSGs que están proyectados hacia el espacio de Disse de la matriz extracelular y atraviesan el endotelio fenestrado siendo arrastrados desde el sinusoides al hepatocito. En la figura 3, se presenta un modelo de cómo los HSPGs de la superficie de las células de Kupffer intervienen en el proceso de migración de los esporozoítos por medio de un mecanismo de extravasación celular donde el parásito penetra al parénquima de la célula hepática. La teoría más aceptada hoy en día es que la invasión está mediada por las células de Kupffer que actúan como transportadora.

Proteínas del merozoíto implicadas en el reconocimiento e invasión al eritrocito

Tanto el esporozoíto como el merozoíto presentan un complejo apical que secreta su contenido durante la invasión a las células del hospedador (Fig. 2). Los mecanismos de invasión del merozoíto al eritrocito no están completamente dilucidados. Se ha establecido que la invasión del merozoíto es un proceso muy rápido de aproximadamente 20 segundos con una secuencia de eventos que se pueden resumir en 4 pasos: (1) contacto del merozoíto con el eritrocito por cualquier parte de la superficie del parásito; (2) orientación del extremo apical hacia la membrana del eritrocito; (3) ataque del complejo apical desplazándose dentro de la célula hospedadora y la unión entre las membranas de ambas células; (4) proceso de internalización del merozoíto por el motor actina/miosina y al mismo tiempo la formación de la VP¹².

Este complejo apical juega un papel esencial en la invasión, ya que el contenido de las roptrias y micronemas es secretado promoviendo una fuerte unión entre la superficie del merozoíto y la membrana del eritrocito²⁷. Esta unión genera una fuerza de penetración mediada por la interacción de las moléculas de actina/miosina del citoesqueleto del parásito y algunas proteínas de la superficie del eritrocito, resultando como producto final del proceso, la formación de la VP donde reside el parásito para multiplicarse asexualmente²⁸. La VP actúa como una barrera semipermeable entre el parásito y el eritrocito permitiendo la adquisición de nutrientes y secreción de proteínas derivadas del parásito. Por lo tanto, la esquizogonia eritrocítica es la parte del ciclo de vida del parásito donde se inicia el desarrollo de estructuras en el eritrocito anucleado hasta formarse el esquizonte maduro con la

consecuente liberación de nuevos merozoítos²⁹(Fig. 1).

Muchas proteínas del merozoíto están involucradas en este proceso, pero muy poco se sabe de su papel en la invasión. En la siguiente tabla presentamos algunas de las proteínas más estudiadas para el diseño de vacunas aunque no están todas ya que cada día se reportan nuevas cantidades en busca de una respuesta inmunológica efectiva (Tabla). Entre las proteínas involucradas la MSP-1 está relacionada en la interacción inicial con el eritrocito^{30,31}. Esta proteína está unida a la superficie del merozoíto por un anclaje tipo GPI, al igual que las MSP-2, MSP-4 y MSP-5³²⁻³⁴. La MSPs son un complejo de proteínas que sufren varios procesos proteolíticos como la MSP-1 dando una serie de polipéptidos, y siendo el péptido de 19 kDa el que permanece unido a la MP del parásito por su extremo carboxílico. Recientemente se han descrito dos proteasas la SUB-1 y 2 que han sido localizadas en los gránulos densos y han sido postuladas como las responsables del clivaje de la MSP-1 en la invasión³⁵.

La proteína denominada AMA1, una proteína integral de membrana, se localiza inicialmente en el cuello de las roptrias y, después de la ruptura del esquizonte, se localiza en la superficie del parásito y su función no ha sido determinada^{29,36}.

Otra proteína secretada por los gránulos densos es la RIMA de 14 kDa en *P. falciparum*. Esta proteína cuya función no ha sido completamente dilucidada, es expresada en el esquizonte tardío y en los merozoítos libres y está localizada sobre la membrana de las nuevas formas de anillo justo después de la invasión, la función no ha sido dilucidada³⁷.

En las roptrias, además de la AMA 1 se han identificado varias proteínas, (Proteínas Asociadas a Roptrias 1 y 2, RAP 1 y RAP 2; y otra menos estudiada RAP-3) formando un complejo, las cuales pueden estar involucradas en la invasión y han sido observadas en la VP en el proceso de penetración al eritrocito^{10,38-40}. Las RAP 1 y 2 fueron aisladas por primera vez en merozoítos de *P. knowlesi* como una molécula de 66 kDa y fueron las primeras proteínas secuenciadas en roptria y localizadas en el conducto de la organela⁴¹.

La proteína antigénica unida al Eritrocito (EBA-175, del inglés erythrocyte binding antigen 175), se ubica en los micronemas y se une a la molécula de Glicoforina A por medio de ácidos siálicos, los cuales generan una carga negativa y por lo tanto está re-

Tabla. Algunas de las proteínas más relevantes en los procesos de invasión del esporozoíto y merozoíto de *Plasmodium* sp.

Estadio del parásito	Nombre abreviado de la proteína	Ubicación	Receptor y función	Candidato para vacuna
Esporozoíto	CSP	Superficie del parásito	Condroitil Sulfato, citoadherencia	SI
Esporozoíto	TRAP	Micronemas	Heparin Sulfato, citoadherencia	SI
Esporozoíto	MAELB	Roptrias	Desconocida	NO
Merozoíto	RESA	Gránulos densos	Asociada a la VP	SI
Merozoíto	RIMA	Gránulos densos	Desconocida	NO
Esporozoíto/ Merozoíto	RAP-1 y RAP-2	Roptrias	Involucrada en la invasión	SI
Merozoíto	AMA-1	Roptrias	Inicial interacción	SI
Merozoíto	SUB 1 y SUB 2	Gránulos densos	Clivaje de las MSPs	NO
Merozoíto	EBA-175	Micronemas	citoadherencia	SI
Merozoíto	MSP1	Superficie del parásito y gránulos densos	Inicial interacción	SI

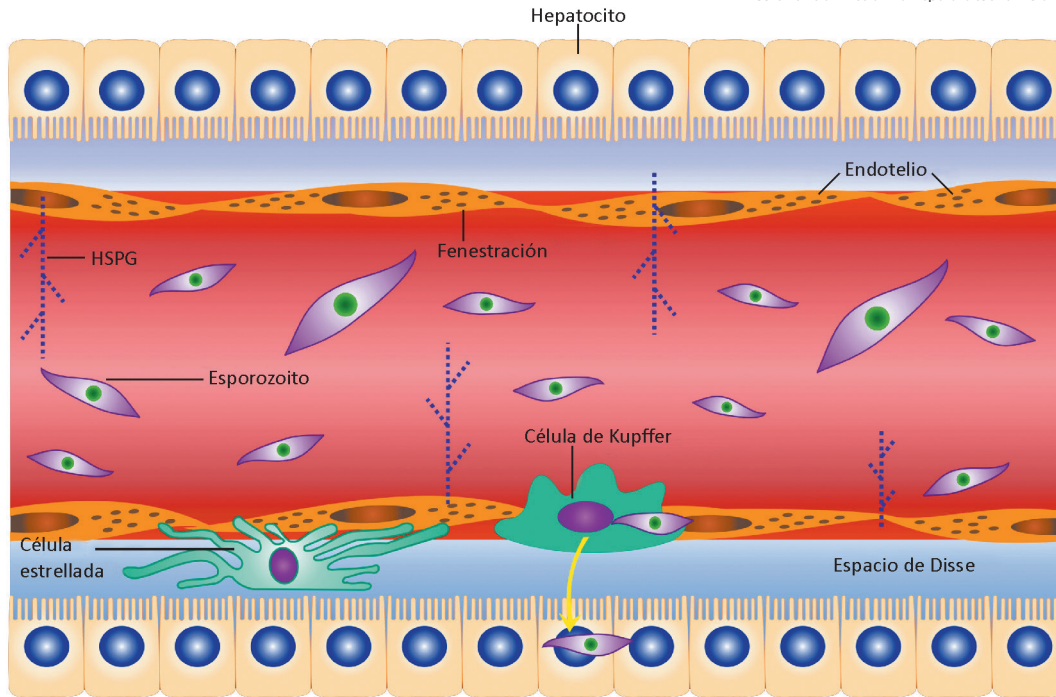


Fig. 3. Mecanismo de infección por el esporozoito al hígado.

Los esporozoítos viajan a través del sistema circulatorio por los vasos, y de esta forma llegan a los hepatocitos. Cuando los esporozoítos llegan a los sinusoides del hígado, ellos se desplazan del endotelio e interactúan con las moléculas altamente sulfatadas de proteoglicanos (HSPGs) resultando en la invasión al hepatocito, proceso mediado por la célula de Kupffer y atravesando el espacio de Disse, o por un mecanismo de fenestración.

lacionada en el contacto inicial entre el parásito y el eritrocito⁴²⁻⁴⁴. Otra proteína llamada EBA-140 (también conocida como BAE-BL) ha sido identificada en la invasión, uniéndose a la molécula de Glicoforina C del eritrocito^{45,46}. Estos hallazgos indican que las moléculas de Glicoforinas A, B y C de la superficie del eritrocito están presentes en relativa abundancia y son los receptores que median el contacto inicial con el parásito.

En el parásito sólo cuatro proteínas localizadas en los gránulos densos del complejo apical han sido identificadas, siendo el antígeno de superficie del eritrocito en forma de anillo infectado (RESA, del inglés ring-infected erythrocyte surface antigen,) el más relevante como candidato a vacuna. Esta proteína es secretada al mismo tiempo que ocurre la invasión, translocándose a través de la membrana de la VP y localizándose bajo la membrana del eritrocito parasitado en asociación con el citoesqueleto^{37,47}. Esta se expresa en el esquizonte tardío y es almacenada en la organela hasta la invasión cuando es liberada.

P. vivax, la otra especie del parásito que es responsable de las manifestaciones clínicas graves en el humano, además de presentar las proteínas antes mencionadas que están conservadas en todas las especies, invade a los reticulocitos (eritrocitos inmaduros), los cuales presentan un grupo de moléculas llamadas receptores Duffy o antígenos Duffy unidas a otras proteínas denominadas proteínas similares a las unidas a Duffy (DBP, del inglés Duffy binding protein) presentes en las roptrias del merozoito⁴⁵. La población negra no presenta infecciones por *P. vivax* porque sus eritrocitos carecen de estos receptores. La familia de proteínas DBL y las proteínas de 235 kDa localizadas en micronemas y roptrias respectivamente intervienen en la selección del tipo de eritrocito a invadir por el merozoito. Sin embargo otros estudios en modelos experimentales con ratones han mostrado que la MSP-7⁴⁹ y la MSP-8⁵⁰ están involucradas en la selección de los eritrocitos a invadir.

Las proteínas involucradas en los mecanismos de invasión del parásito en sus diferentes estadios infectantes y sus modificaciones, son estrategias empleadas para cito-adherirse a diferentes tipos de células hospedadoras y multiplicarse en ellas. Los conocimientos de estas proteínas pueden ser utilizados en el desarrollo de fármacos y en el diseño de vacunas antimaláricas.

Conclusiones

El estadio inicial de malaria incluye la migración de los esporozoítos de la piel al hígado, la invasión de los hepatocitos y subsecuentemente el desarrollo del parásito al estadio de merozoito. Estos pasos obligatorios para establecer una infección exitosa en el hospedador vertebrado involucran una serie de proteínas que son esenciales en los mecanismos de invasión del *Plasmodium* a las células del hospedador como son las proteínas parecidas a Subtilisina (SUB-1 y SUB-2), RESA, CSP, TRAP y las MSPs. La aplicación lógica de estos conocimientos es una herramienta básica para la selección de una o unas proteínas candidatas a vacuna y control terapéutico para la enfermedad, por lo que se requiere un profundo entendimiento de los complejos moleculares y los procesos que están relacionados en la invasión celular en malaria.

Agradecimientos

Le agradecemos al Decanato de Investigación y Desarrollo de la Universidad Simón Bolívar (DID-USB) por apoyar la búsqueda de información para la realización de este artículo. Nosotros nos disculpamos con los investigadores que trabajan en esta área y no han sido citados en este trabajo por límite de espacio. También queremos agradecerle a Alberto Louro por su crítica revisión del manuscrito.

Referencias bibliográficas

1. World Health Organization: World Malaria Report 2011. http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/
2. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Renneberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. (2006) Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 313(5791):1287-90.
3. Sinden RE (2002) Molecular interactions between *Plasmodium* and its insect vectors. *Cell Microbiol*. 4: 713-724.

4. Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodriguez A (2001) Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science* 291: 141–144.
5. Matuschewski K, Nunes AC, Nussenzweig V, Menard R (2002) Plasmodium sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. *EMBO J.* 21: 1597–1606.
6. Baldacci P, Menard R (2004) The elusive malaria sporozoite in the mammalian host. *Mol. Microbiol.* 54: 298–306.
7. Prudêncio M and Mota M (2007). To Migrate or to Invade: Those Are the Options. *Cell Host Microbe* 2: 286–288.
8. Garnham PCC (1988). Hypnozoites and “relapses” in Plasmodium vivax and in vivax-like malaria. *Trop. Geogr. Med.* 40: 187–195.
9. Cowman AF, Crabb BS (2006) Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 124: 755–766.
10. Bannister LH, Hopkins JM, Fowler RE, Krishna S, Mitchell GH (2000a) Ultrastructure of rhoptry development in Plasmodium falciparum erythrocytic schizonts. *Parasitology* 121: 273–287.
11. Kats LM, Black CG, Proellocks NI, Coppel RL (2006) Plasmodium rhoptries: how things went pear-shaped. *Trends Parasitol.* 22: 269–276.
12. Kats LM, Cooke BM, Coppel RL, Black CG (2008) Protein trafficking to apical organelles of malaria parasites – Building an invasion machine. *Traffic* 9: 176–186.
13. Bannister LH, Hopkins JM, Fowler RE, Krishna S, Mitchell GH (2000b) A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages. *Parasitol. Today* 16: 427–433.
14. Schrevel J, Asfaux-Foucher G, Hopkins JM, Robert V, Bourgoïn C, Prensier G, Bannister LH (2007) Vesicle trafficking during sporozoite development in Plasmodium berghei: ultrastructural evidence for a novel trafficking mechanism. *Parasitology* 135 : 1–12.
15. Preiser P, Kaviratne M, Shahid Khan S, Lawrence Bannister L, Jarra W (2000) The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect.* 2: 1461–1477.
16. Stewart MJ, Vanderberg JP (1991). Malaria sporozoites release circumsporozoite protein from their apical end and translocate it along their surface. *J. Protozool.* 38: 411–421.
17. Ballou WR, Hoffman SL, Sherwood JA, Hollingdale MR, Neva FA, Hockmeyer WT, et al. (1987) Safety and efficacy of a recombinant DNA Plasmodium falciparum sporozoite vaccine. *Lancet* 1: 1277–81.
18. Posthuma G, Meis JF, Verhave JP, Hollingdale MR, Ponnudurai T, Meuwissen JH, Geuze HJ (1988) Immunogold localization of circumsporozoite protein of the malaria parasite Plasmodium falciparum during sporogony in Anopheles stephensi midguts. *Eur. J. Cell Biol.* 46:18–24.
19. Dolo A, Modiano D, Doumbo O, Bosman A, Sidibé T, Keita MM, Naitza S, Robson KJ, Crisanti A (1999) Thrombospondin related adhesive protein (TRAP), a potential malaria vaccine candidate. *Parasitologia* 41:425–8.
20. Mota MM, Rodriguez A (2001) Migration through host cells by apicomplexan parasites. *Microbes infect.* 3: 1123–1128.
21. Pradel G, Garapaty S, Frevert U (2002) Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. *Mol. Microbiol.* 45: 637–651.
22. Noe AR, Adams JH (1998) Plasmodium yoelii YM MAEBL protein is coexpressed and colocalizes with rhoptry proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 96: 27–35.
23. Pinzon-Ortiz C, Friedman J, Esko J, Sinnis P (2001). The binding of the circumsporozoites protein to cell surface heparan sulfate proteoglycans is required for Plasmodium. *J. Biol. Chem.* 276: 26784–26791.
24. Sinnis P, Coppi A (2007) A long and winding road: the Plasmodium sporozoite's journey in the mammalian host. *Parasitol. International* 56: 171–178.
25. Pradel G, Frevert U (2001) Malaria sporozoites actively enter and passage through Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology* 33: 1154–1165.
26. Shin S, Vanderberg J, Terzakis J (1982). Direct Infection of hepatocytes by sporozoites of Plasmodium berghei. *The Journal Protozoology* 11 : 352–359.
27. Gratzler WB, Dluzewski AR (1993) The red blood cell and malaria parasite invasion. *Semin. Hematol.* 30: 232–247.
28. Cowman AF, Baldi DL, Healer J, Mills KE, O'Donnell RA, Reed MB, Triglia T, Wickham ME, Crabb BS (2000) Functional analysis of proteins involved in Plasmodium falciparum merozoite invasion of red blood cells. *FEBS Lett.* 476: 84–88.
29. Bannister LH, Dluzewski AR (1990) The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. *Blood Cells* 16: 257–292. Holder AA, Freeman RR (1984) The three major antigens on the surface of Plasmodium falciparum merozoites are derived from a single high molecular weight precursor. *J. Exp. Med.* 160: 624–629. Holder AA, Blackman MJ (1994) What is the function of MSP-1 on the malaria merozoite?. *Parasitol. Today.* 10:182–184.
30. Smythe JA, Coppel RL, Brown GV, Ramasamy R, Kemp DJ, Anders RF (1988) Identification of two integral membrane proteins of Plasmodium falciparum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5195–5199.
31. Marshall VM, Silva A, Foley M, Cranmer S, Wang L, McColl DJ, Kemp DJ, Coppel RL (1997) A second merozoite surface protein (MSP-4) of Plasmodium falciparum that contains an epidermal growth factor-like domain. *Infect. Immun.* 65: 4460–4467.
32. Marshall VM, Tieqiao W, Coppel RL (1998) Close linkage of three merozoite surface protein genes on chromosome 2 of Plasmodium falciparum. *Mol. Biochem. Parasitol.* 94: 13–25.
33. Barale J.C., Blisnick T, Fujioka H., Alzari P.M., Aikawa M., Braun-Bretton C., Langsley G.(1999) Plasmodium falciparum subtilisin-like protease 2, a merozoite candidate for the merozoite surface protein 1–42 maturase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6445–6450.
34. Miller LH, Aikawa M, Johnson JG, Shiroishi T (1979) Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation. *J. Exp. Med.* 149: 172–184.
35. Trager W, Rozario C, Shio H, Williams J, Perkins ME. (1992) Transfer of a dense granule protein of Plasmodium falciparum to the membrane of ring stages and isolation of dense granules. *Infect. Immun.* 60: 4656–4661.
36. Aikawa M, Miller LH, Johnson J, Rabbege J (1978) Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J. Cell Biol.* 77: 72–82.
37. Bannister LH, Butcher GA, Dennis ED, Mitchell GH (1975) Structure and invasive behaviour of Plasmodium knowlesi merozoites in vitro. *Parasitology* 71: 483–491.
38. Iyer J, Grüner AC, Renia L, Snounou G, Preiser PR (2007) Invasion of host cells by malaria parasites: a tale of two protein families. *Mol. Microbiology* 65: 231–249.
39. Crewther PE, Culvenor JG, Silva A, Cooper JA, Anders RF (1990) Plasmodium falciparum: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. *Exp. Parasitol.* 70:193–206.
40. Camus D, Hadley TJ (1985) A Plasmodium falciparum antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. *Science* 230: 553–556.
41. Mayer DCG, Kaneko O, Hudson-Taylor DE, Reid ME, Miller LH (2001) Characterization of a Plasmodium falciparum erythrocyte-binding protein paralogous to EBA-175. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 5222–5227.
42. Sim BKL, Carter JM, Deal CD, Holland C, Haynes JD, Gross M (1994) Plasmodium falciparum: further characterization of a functionally active region of the merozoite invasion ligand EBA-175. *Exp. Parasitol.* 78: 259–268.
43. Narum DL, Fuhrmann SR, Luu T, Sim BKL (2002) A novel Plasmodium falciparum erythrocyte binding protein-2 (EBP2/BAEBL) involved in erythrocyte receptor binding. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119: 159–168.
44. Thompson JK, Triglia T, Reed MB, Cowman AF (2001) A novel ligand from Plasmodium falciparum that binds to a sialic acid-containing receptor on the surface of human erythrocytes. *Mol. Microbiol.* 41: 47–58.
45. Rug M, Wickham ME, Foley M, Cowman AF, Tilley L. (2004)
46. Correct promoter control is needed for trafficking of the ring-infected erythrocyte surface antigen to the host cytosol in transfected malaria parasites. *Infect Immun.* 72(10):6095–105. Galinski MR, Barnwell JW (1996) Plasmodium vivax: merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. *Parasitol. Today* 12: 20–29.
47. Tewari, R., Ogun, S.A., Gunaratne, R.S., Crisanti, A., and Holder, A.A. (2005) Disruption of Plasmodium berghei merozoite surface protein 7 gene modulates parasite growth in vivo. *Blood* 105: 394–396.
48. Shi, Q., Cernetich, A., Daly, T.M., Galvan, G., Vaidya, A.B., Bergman, L.W., and Burns, J.M., Jr (2005) Alteration in host cell tropism limits the efficacy of immunization with a surface protein of malaria merozoites. *Infect. Immun.* 73:6363–6371.

Recibido: 15 de marzo de 2016.

Aprobado: 30 de abril de 2016.

“Voci su Ebola” Project: a brick of the “Science Memories” Archive

Proyecto “Voci Do Ébola”: una parte del archivo “Science Memories”

Paola Vaccaro

DOI. 10.21931/RB/2016.01.02.10

Introduction

Science history and social impact of science does not pass only through written communication. Testimonies, memories, experiences of the multitude of people involved in any kind of scientific activities are a potential archive of the history of scientific processes.

Oral history has now regained the dignity it had in antiquity as a source to preserve and rebuild the memory. This is well exemplified by the huge collection of memories realized by the British Library, with the Oral History of British Science¹, a unique collection of biographical interviews in which scientists, engineers and technologists reflect on their early life and background, their career and their involvement in the course of UK science in the twentieth century. Over a thousand hours of unedited interviews are made available in full on this website, while the Voices of Science web resource offers curated access to audio and video highlights from the interviews organised by theme, discipline and interviewee.

Nowadays historiography “without writing” is considered fundamental, especially as regards the social history. Even in the history of science we are seeing a recovery of the centrality of oral history. Reasons for this are both the unique ability to rebuild what Albert Einstein called the “personal struggle”, the tortuous personal journey that leads the researcher to the goal, and to rebuild the social history of science.

The goal of the “Science Memories” Project (“Memorie di Scienza”)² is to give voice to these testimonies, and body to a searchable archive. The archive, dedicated to the Italian scientific journalist Romeo Bassoli, is based on the idea of collecting oral histories, stories and narratives of the different figures who live the world of science: researchers, technicians, journalists, decision-makers, people still involved in the design and conduct of scientific research and its applications. The collection will constitute an oral archive available via web in open access mode. The collection will include both original contributions, and the identification of existing but difficult to find or to use materials.

The “Voci su Ebola” (Rumors/Voices about Ebola) project means to collect oral testimonies about the Ebola outbreak that hit West Africa in 2014-2015.

This project was awarded with the Romeo Bassoli Prize 2015. The prize, instituted by the National Institute of Nuclear Physics (INFN) and the International School for Advanced Studies (SISSA), aims at giving voice to experiences about scientific research, collecting and organizing them in the “Science Memories” archive. The initiative reflects the awareness that oral evidence and narrations need to be collected and preserved since they are, similarly to writing, powerful tools of dissemination, communication and historical evidence.

The main objection to the oral sources by a methodologically conservative historiography has always been based on the issue of reliability: you can not give credence to the storytellers because memory and subjectivity “distort” the facts. Now, apart from the fact that this does not always happen or necessarily (nor indeed can we be sure that there are not as serious distortions, albeit for other reasons, in archive documents), all the more pressing oral historiography reasoned exactly the opposite: the oral sources are important and fascinating precisely because they are not limited to “witness” the facts but work on them and build their way through the work of memory and the speech filter³.

Reference context and objectives of the “Voci su Ebola” project

The scenario in which the project is developing is the Ebola outbreak that hit West Africa in 2014-2015, with particular emphasis on the media impact of the cases involving two Italian health workers.

The goal is to create a series of audio interviews with experts and medical and paramedical personnel directly involved in the event. These interviews, recorded and edited in the form of podcasts, will be published on the web in open access mode.

In November 2014 and in May 2015 there have been two cases of Ebola Virus Disease involving Italian patients^{4,5,6}. They were Fabrizio Pulvirenti and Stefano Marongiu, infected while serving voluntary service in Sierra Leone on behalf of the NGO Emergency, respectively, as an infectious disease physician and as a health-care assistant.

Both patients were transferred to conditions of biocontainment^{7,8} at the Lazzaro Spallanzani Institute in Rome, and assisted by a team of about 30 people (15 doctors and 15 volunteer nurses).

Emergency is an independent and neutral Italian organization, which since 1994 provides free and high quality medical and surgical care to the victims of war, landmines and poverty; it operates in Italy and all over the world, and is present since 2001 in Sierra Leone with a surgical center and a children's hospital. In response to Ebola outbreak, Emergency opened a First Aid Post and two Centers for the Treatment of the disease.

The Lazzaro Spallanzani National Institute for Infectious Diseases (INMI) - IRCCS is a public institution operating since 1936 in Italy, as the National Reference Center for highly infectious diseases. In October 2014, the INMI was commissioned by Italian Ministry of Foreign Affairs of the Technical and Scientific Coordination of Italian intervention of cooperation in Sierra Leone⁹.

Following the hospitalization of the two Italians and the news coming from Africa, the media went into fibrillation, creating a disproportion between the “real” epidemic and the “mediatic” one, and fueling outbreaks of racism already present in Italy^{10,11}. For better or for worse, the messages conveyed as by experts as by ordinary people through social networks were present over and above the traditional media¹².

As already happened in the '80s with AIDS¹³, amplification of individual anxieties and their social impact overlapped to the benefits of a widespread information. For the “mediatic” epidemic the intensification of the news has been not proportional to the number of clinical cases, but to that of global “sounding boards” in form of online newspapers, or “social” sites. So, Ebola has been defined as “the plague of the third millennium”, pace of the plague itself, recounted in so many Italian and foreign literature, responsible for millions of deaths in history and still present in the world (3000 cases per year, according WHO)¹⁴.



Paola Vaccaro worked for many years as a researcher, giving her contribute in the fields of marine biology, neuroscience and biotechnology, especially in Phage Display. She has coauthored several papers that were published in peer-review journals, like PNAS, Marine Biology, JBC, among others

Recently her interests switched on science communication: her “Voci su Ebola” project was awarded with Romeo Bassoli's Prize; at the moment she's collecting different oral witnesses about the last Ebola outbreak.

About a year after the first Italian case of Ebola Virus Disease, it is possible to have from the experts a clearer picture of the state of art in the fight against this dreaded virus and in the management of communication in presence of an international health crisis. All the more so that in this case, in addition to providing valuable medical treatments, for the first time the conditions were also created for the advancement of knowledge in combating the virus, with a scientific research “on the field”^{10, 15, 16, 17}.

For this project, a testimony is being required to the protagonists of those days, and in particular to the Lazzaro Spallanzani National Institute for Infectious Diseases' team: the Scientific Director, the Head of UOC Viral Immunodeficiencies and Infectious Neuro-oncology, the Head of UOC Infectious and Tropical Diseases, the Head of UOC of Laboratory of Virology, the Head of Microbiology Unit and Biological Bank. To get a complete picture, it will be heard also the live voice of nurses and technicians who have dealt directly of the two patients.

As for the Emergency NGO, we mean to collect testimonies by the President of the Association, the Manager Director of the Association's quarterly magazine, the co-founder of the Association and Executive Director, the medical coordinator of the center of Lakka, Sierra Leone, and any other medical and/or volunteers who have served in Sierra Leone service; the two Italian patients of Ebola Virus Disease; the Press Officer.

Testimonies of ordinary people, Italians and foreigners living in Italy, there will also be collected, to give an idea of what was the extent of the perceived danger in the days of the epidemic.

The interviews will focus on different levels: to the medical staff and researchers will be asked about both clinical and technical-scientific point of view, trying to frame the situation from a historical perspective; in general, we will also seek a personal reflection on the matter.

Methodology and timing of the project

The interviews will be made with a Zoom H4 microphone to record both indoors and outdoors. When it will not be possible to reach the scene in person, if the doctors are serving overseas, an internet connection will be used. It will still be privileged the interview “face to face”, avoiding as much as possible telephone connections or remote that worsen dramatically the audio quality.

The main interviews (doctors, employees of Emergency and the “insiders”) will be individually edited, for the sake of clarity and transmissibility of “expert voices”. The interviews to the common people will be grouped so as to provide a lively and dynamic testimony, which reflects the actual media impact on society.

For the assembly and manufacture of the podcast a MacBook Pro computer will be used, equipped with the Logic Pro audio software.

It is planned to complete the collection of testimonies by the end of April 2016, and to make the creation and delivery of materials by September 2016.

Project communication strategies

The entire collection of oral interviews will be archived on a sound sharing platform (world leader in the field is Soundcloud - <https://soundcloud.com/pages/contact>), with creative commons license, available for listening and non-profit sharing.

A dedicated profile on major social networks will be created, to share the interviews in a widespread manner. Essential, in addition to the usual Facebook and Twitter, will be the opening of a YouTube channel: any website that operates in science cannot be separated today from including a number of video content¹³.

At the publication of online interviews, press releases will be sent to the major newspapers and news agencies. The collected material could be presented during a dedicated day, and diffused by radio broadcasts of scientific communication (as Rai Radio3Scienza), or via web radios.

References

1. Oral history of British science. Visited: 20-01-2016. Available in: <http://sounds.bl.uk/oral-history/science>
2. Perché. Memorie di scienza - dedicato a Romeo Bassoli. Visited: 16-01-2016. Available in: <http://www.zadig.it/contenuti/memorie-di-scienza-dedicato-romeo-bassoli>
3. Portelli A. Un lavoro di relazione. Osservazioni sulla storia orale. Tripod. Visited: 20-01-2016. Available in: <http://libur.tripod.com/Portelli2.htm>
4. Mala L. Scrive qui i nomi di tutte le donne uccise. Conaca. Visited: 20-01-2016. Available in: http://www.repubblica.it/cronaca/2014/11/25/news/ebola_tornato_in_italia_il_medico_di_emergency_contagiato_aereo_a_pratica_di_mare-101348102/
5. La Nuova. Visited: 20-01-2016. Available in: <http://lanuovasardegna.gelocal.it/sassari/cronaca/2015/05/12/news/sassari-arriva-la-conferma-l-infermiere-e-malato-di-ebola-1.11406935>
6. Fabrizio Pulvirenti, La mia battaglia contro Ebola. Giugno 2015, Feltrinelli.
7. Ebola: paziente arrivato in Italia. Visited: 20-01-2016. Available in: https://www.youtube.com/watch?v=iQn_Wa8a2CQ Procedure operative e documenti per la gestione del virus Ebola. Visited: 16-01-2016. Available in: http://www.inmi.it/procedure_operative_virus_ebola.html
8. IRCCS Lazzaro Spallanzani. 2016. Visited: 20-01-2016. Available in: http://www.inmi.it/file/EBOLA_2015/05%20-%20Cronologia%20attivit%20INMI%20per%20EBOLA%20al%20giugno%202015.pdf
9. %20INMI%20per%20EBOLA%20al%20giugno%202015.pdf
10. Satolli R, Strada G, Zona Rossa, Feltrinelli. 2015
11. Il giornale.it. Visited: 16-01-2016. Available in: <http://www.ilgiornale.it/news/cronache/mi-attacchi-lebola-picchiata-donna-africana-1061674.html>
12. Salce L, Barbato S, Renna D, Bianchini F, Vaccaro P, Mazzeo F, Gasparini A, Rizza
13. C, Lanfranchi E, Petrosillo N, Nicastrì E, Di Caro A, Capobianchi MR, Puro V, Russo A, Ippolito G on behalf of INMI EBOV Team. First Italian Ebola Virus Disease case: management of hospital internal and external communication. *New Microbiologica* 2015, 38: 565-570.
14. Vaccaro P, La scienza in video ai tempi della rete. Thesis, Master "SGP - La scienza nella pratica giornalistica", Sapienza Università di Roma A.A. 2013/2014
15. Epicentro: Il portale dell'epidemiologia per la sanità pubblica. 2015. Visited: 16-01-2016. Available in: <http://www.epicentro.iss.it/problemi/peste/peste.asp>
16. Lanini S, Zumla A, Ioannidis JP, Di Caro A, Krishna S, Gostin L, Girardi E, Pletschette M, Strada G, Baritussio A, Portella G, Apolone G, Cavuto S, Satolli R, Kremsner P, Vairo F, Ippolito G. Are adaptive randomised trials or non-randomised studies the best way to address the Ebola outbreak in west Africa? *Lancet Infect Dis*. 2015 Jun;15(6):738-45. doi: 10.1016/S1473-3099(15)70106-4
17. Satolli R. Ebola in Sierra Leone. 2014. Visited: 16-01-2016. Available in: <http://www.scienzainrete.it/contenuto/articolo/radio3scienza/prove-tecniche-contro-ebola/novembre-2014>
18. Cosa ci insegna l'epidemia di Ebola in Africa Occidentale. 2015. Visited: 16-01-2016. Available in: <http://www.scienzainrete.it/contenuto/articolo/roberto-satolli/cosa-ci-insegna-lepidemia-di-ebola-africa-occidentale/maggio-2015>

Recibido: 14 de marzo de 2016.

Aprobado: 7 de abril de 2016.

Apertura de la Carrera de Medicina en la Universidad Técnica del Norte. Un sueño hecho realidad para el norte del Ecuador

Opening of the Career of Medicine at the Technical University of the North. A dream come true for northern Ecuador

Salomé Gordillo Alarcón, Miguel Naranjo Toro, Rocío Castillo

DOI. 10.21931/RB/2016.01.02.11

Antecedentes

En el año 2013, la autoridad máxima de la Universidad Técnica del Norte Dr. Miguel Naranjo y la Sra. Subdecana de la Facultad Ciencias de la Salud Mgs. Rocío Castillo, realizan el encargo a la Dra. Magister Salomé Gordillo, de elaborar el proyecto de creación de la carrera de Medicina, entregando un documento de trabajo anterior sobre el tema elaborado por el Dr. Miguel Naranjo, Dr. Carlos Ramírez, Dr. Galo Posso y Mgs. Rocío Castillo.

La Dra. Salomé Gordillo inicia el trabajo considerando varios aspectos:

1. La base legal vigente, desde la constitución de la república (2008), Plan Nacional del Buen Vivir (2013-2017).
2. La normativa de Educación Superior específicamente el Reglamento de Régimen Académico.
3. La normativa del sector salud especialmente el modelo de gestión del Ministerio de Salud Pública y el Modelo de atención Integral en Salud (MAIS).

En el mes de Julio del 2013 el proyecto de creación de la carrera de Medicina se aprueba en el Honorable Consejo Universitario de la Universidad Técnica del Norte, iniciándose de esta forma el proceso de aprobación en el Consejo de Educación Superior.

Este proceso ha resultado ser muy complejo sin embargo de un elevado aprendizaje, el proyecto fue repetidamente

evaluado por profesionales nacionales y extranjeros con altos conocimientos pedagógicos y curriculares. Se han realizado las correcciones a las recomendaciones sugeridas por ellos, se presentó el proyecto a representantes del Consejo de Educación Superior (CES), Consejo de Evaluación, Acreditación y Aseguramiento de la Calidad de la Educación Superior (CEAACES), Ministerio de Salud Pública entre otros.

Las modificaciones en el Reglamento de Régimen Académico hacen que el proyecto se modifique por varias ocasiones, concluyéndose el mismo en octubre del 2015, enviándolo al Consejo de Educación Superior a través de su plataforma virtual.

En enero del 2016, se emiten dos informes de evaluación en los que se indica:

- a) Por parte de SEMPLADES, se da un informe favorable luego de evaluar la pertinencia del proyecto.
- b) Por parte del evaluador externo que emite un informe favorable con cambios mínimos.

Se realizan los cambios correspondientes, sin embargo, en marzo del 2016 se realiza una nueva modificación del Reglamento de Régimen Académico específicamente para las carreras de Medicina, por lo que se realizan las modificaciones correspondientes y se envía para su revisión final.

En el mes de Julio se realiza la presentación del proyecto de creación de la carrera de Medicina y el 3 de agosto del 2016 el pleno del Consejo de Educación Superior lo aprueba con resolución N° RPC-SO-30-No.538-2016

Dra. Salomé Gordillo Alarcón. Coordinadora de la Carrera de Medicina. Universidad Técnica del Norte. Ibarra. Ecuador

Dr. Miguel Naranjo Toro (Docente-Rector Universidad Técnica del Norte)

Mgs. Rocío Castillo (Docente-Decana Facultad Ciencias de la Salud - Universidad Técnica del Norte) Correspondencia: E.mail. asgordillo@utn.edu.ec

Contexto

La carrera de Medicina se encuentra dentro de la estructura organizacional de la Facultad Ciencias de la Salud conjuntamente con las carreras de Enfermería, Nutrición y Salud Comunitaria, y Terapia Física Médica, en la Universidad Técnica del Norte; cuyo ámbito de acción corresponde a la Zona 1 del Ecuador: provincias de Esmeraldas, Carchi, Imbabura, y Sucumbios.

La necesidad de la creación de la carrera de Medicina se fundamenta en varios aspectos:

1. La falta de profesionales médicos en el país, si consideramos que la OMS estima que 23 trabajadores de la salud por 10.000 habitantes, (médicos, enfermeras) sería la cantidad mínima para alcanzar la cobertura de las necesidades de atención primaria de salud.¹

2. En nuestro país de acuerdo a un estudio realizado por el INEC en el año 2010, del personal de la salud por regiones y provincias se puede indicar que a nivel nacional existen 16,63 médicos por 10.000 habitantes, con una elevada variabilidad en cada provincia.² (Fig. 1).

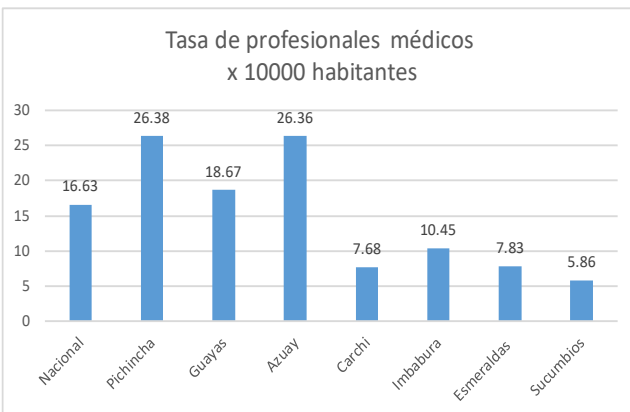


Fig. 1. Tasa de profesionales médicos de la salud en Ecuador por cada 10000 habitantes. Fuente. INEC 2013 Anuario de las Estadísticas de Recursos y actividades de la Salud

3. Determinación de la demanda de formación profesional en la Zona 1; el departamento de Planeamiento de la Universidad Técnica del Norte realiza en el año 2015 el estudio sobre "Determinación de la demanda de formación profesional de la zona 1 a nivel de la educación superior", con una muestra de 3538 encuestados estudiantes de tercer año de bachillerato pertenecientes a 380 colegios públicos y privados de la Zona de Planificación 1 Norte, obteniéndose los siguientes resultados, el 17,78% de los encuestados determinaron que quisieran estudiar la carrera de Medicina, como primera alternativa en su formación profesional.³

4. Se considera además los altos costos que implica que un estudiante acuda a realizar sus estudios profesionales y de medicina en el caso que nos ocupa en la ciudad de Quito u otras ciudades del país: hospedaje, alimentación, transporte, material de estudio y los propios gastos de estudio.

5. El análisis de la oferta académica en el país de formación en Medicina permitió evidenciar que en las Zonas 1 y 2 del Ecuador no existen universidades que oferten la carrera de Medicina, en la provincia de Pichincha se encuentran 5 universidades, de las cuales 4 son privadas y solo 1 es pública. En el gráfico siguiente se indica la oferta académica de carreras de medicina en el país por zonas territoriales (Fig.2):

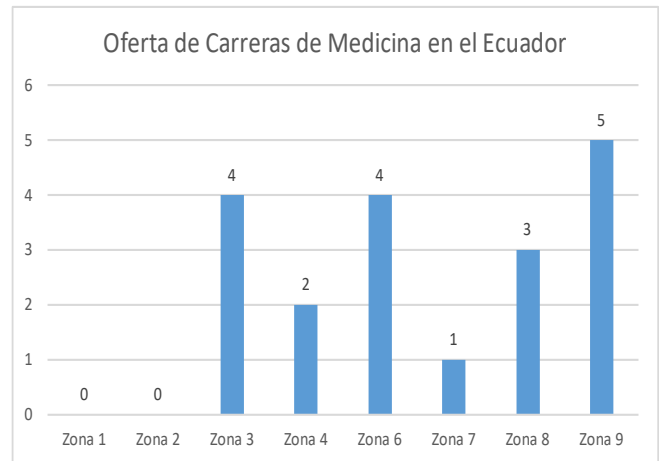


Fig. 2. Oferta académica de carreras de medicina en el país por zonas territoriales. Fuente Estadísticas Consejo de educación Superior 2014.

Descripción de la Carrera de Medicina

Número de períodos ordinarios	11 (Incluye año de Internado Rotativo)
Número de Asignaturas	70
Número de Horas/Período	900
Título que otorga	Médico/a

Objetivo general de la Carrera de Medicina

Formar profesionales médicos, capaces de garantizar un servicio de salud eficiente, con calidad y calidez, basados en la propuesta de atención primaria de salud renovada y la promoción de la salud, considerando las políticas nacionales en el sector salud, acorde a los derechos de la ciudadanía, y las necesidades establecidas en el Plan Nacional del Buen Vivir, con criterios de excelencia, críticos, humanistas, con la finalidad de contribuir al desarrollo humano.

Recursos existentes en la Universidad Técnica del Norte

Talento Humano: Profesionales médicos de alto nivel con formación académica de cuarto nivel. Especialistas, Magister, PHD. Con experiencia en docencia universitaria, investigación y en actividades médicas.

Infraestructura: Edificio de la Facultad Ciencias de la Salud en el que se encuentran las aulas con disponibilidad para 40 estudiantes de manera confortable, dispone de tecnología audiovisual en cada una de ellas.

Biblioteca en la que existe el material tanto impreso como virtual para el estudio de la carrera de Medicina, acceso a las más importantes bases de datos Médicas.

Equipamiento: Laboratorio de Morfofisiología I y II: Con la más alta tecnología: dos mesas de disección anatómica virtual y más de 100 maquetas para estudios de anatomía, fisiología, embriología.

Clínica de Simulación: Que incluye áreas de Medicina Interna, Pediatría, Gineco Obstetricia y Cirugía, en ellas el estudiante podrá visualizar los procesos fisiológicos (normales) y patológicos en simuladores (modelos anatómicos con procedimientos virtuales), en los cuales pueden realizar sus prácticas para la adquisición de destrezas y habilidades antes de presentarse ante un paciente real.

Laboratorios de Bioquímica, Biofísica, Microbiología, Parasitología y otros que permiten el aprendizaje teórico y práctico de las diversas asignaturas.

Por último, está disponible el laboratorio de Biología Molecular que permite la realización de la investigación experimental que el ámbito de la salud es indispensable.

Recibido: 14 de agosto de 2016.

Aprobado: 7 de septiembre de 2016.



Referencias bibliográficas

- Organización Mundial de la Salud. (2009). El personal sanitario es imprescindible para lograr los Objetivos de Desarrollo del Milenio relacionados con la salud. http://www.who.int/hrh/workforce_mdgs/es/
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2013). Anuario de Recursos y Actividades de Salud. Quito: INEC.
- Universidad Técnica del Norte. (2015). Determinación de la demanda de formación profesional de la zona 1 a nivel de la Educación Superior. Ibarra: UTN.