

# Bionatura

Biomedical Engineering in Yachay Tech University

*Bradypus variegatus*

Estudios Preclínicos  
Contexto Actual

Growth Hormone Secretagogue

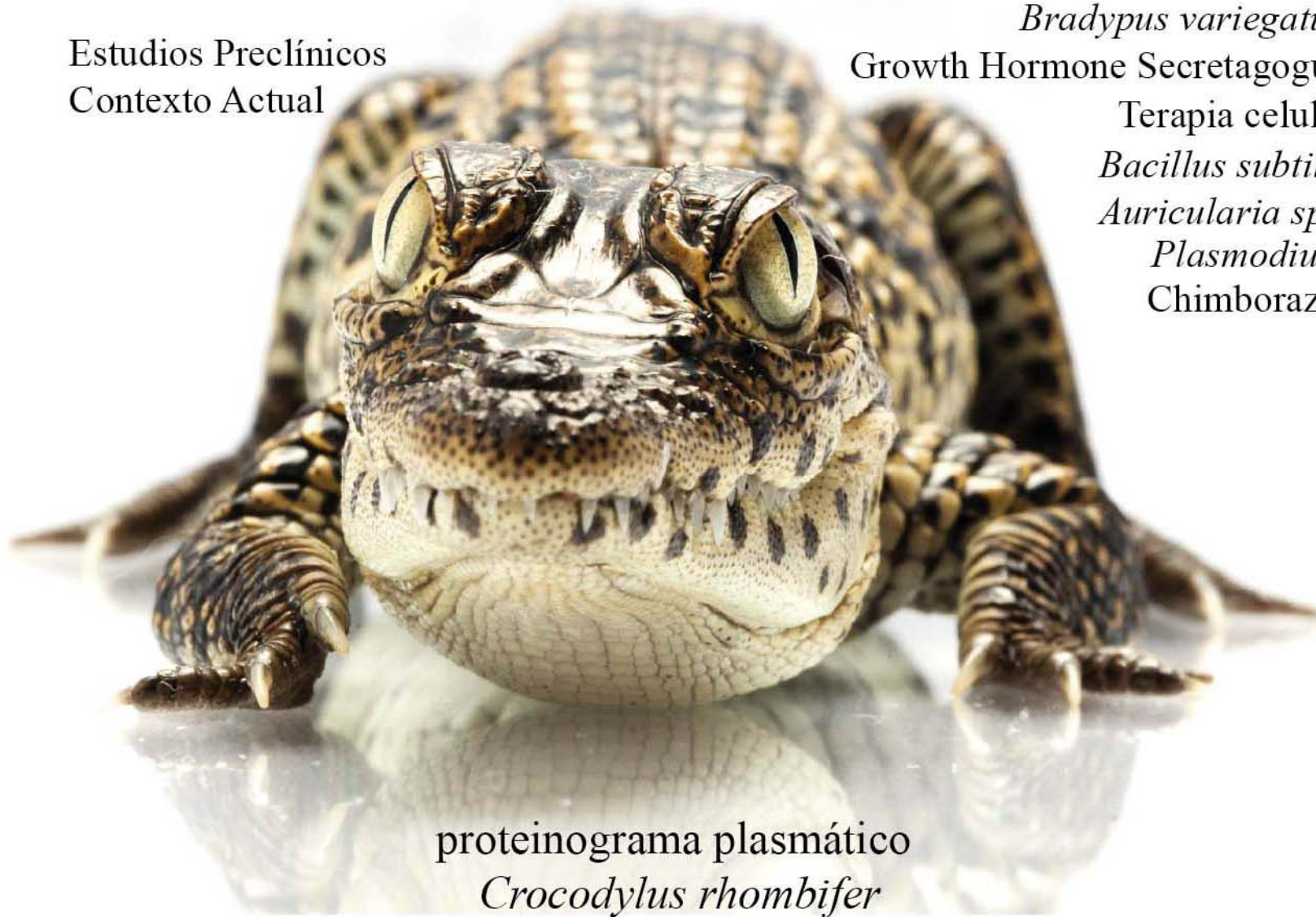
Terapia celular

*Bacillus subtilis*

*Auricularia spp*

*Plasmodium*

Chimborazo



proteínograma plasmático

*Crocodylus rhombifer*



**INTERNATIONAL**  
Scientific Indexing



**ICMJE**

INTERNATIONAL COMMITTEE of  
MEDICAL JOURNAL EDITORS





Presenta a usted el **Vademécum Farmacéutico Edifarm**, el compendio de información más completo del país.

[http://edifarm.com.ec/edifarm\\_quickmed/](http://edifarm.com.ec/edifarm_quickmed/)

*Vademécum multimedia con la información básica para prescribir de aproximadamente 5.000 productos farmacéuticos ecuatorianos, presenta búsquedas por:*

- Producto
- Ingrediente Activo
- Laboratorio
- Clasificación ATC.
- Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE10)



**Versión Web**

*Además de incluye precios de venta al público referenciales: totales y unitarios, dosis en pediatría, reacciones adversas e interacciones medicamentosas.*

*Otras versiones:*



**Versión Móvil (QuickMed®)**

Teléfonos inteligentes y tablets  
<http://edifarm.com.ec/mobile>



[www.edifarm.com.ec](http://www.edifarm.com.ec)

Azuarcas N45-311 y Malvas - Teléfonos: (593-2) 292-3105 / 292-3106  
Quito • Ecuador





## 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.

Revistas Médicas (CIERM). 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, 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/mbel-vancouver.htm#ilustraciones%20\(figura\)](http://www.fisterra.com/recursos_web/mbel-vancouver.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.

## ÍNDICE / INDEX

### EDITORIAL

- Contexto actual de los estudios preclínicos** 103  
*Current context of preclinical studies*  
*Dra. Thelvia I. Ramos*

### CARTA AL EDITOR

- Ciencias de la vida en la Universidad de Yachay Tech en Ecuador** 106  
*Life Sciences at the University of Yachay Tech in Ecuador*  
*Graciela Salum, Si Amar Dahoumane, Spiros N. Agathos*

### INVESTIGACIÓN

- Evaluación del proteinograma plasmático del cocodrilo Cubano (*Crocodylus rhombifer*)** 107  
*Evaluation of plasmatic proteinogram of Cuban crocodile (*Crocodylus rhombifer*)*  
*Vivian Morera, Arline Fernández, Claudia Puentes, Etiam Pérez, Gustavo Sosa, Leiter Guerra, Félix Santana y Yoamel Milian*

- Área de vida, dieta, preferencia de estrato vertical y uso del tiempo de *Bradypus variegatus*, liberados en la Estación Científica Agroecológica Fátima** 118  
*Living area, diet, preferably vertical stratum and time use of *Bradypus variegatus*, released in Fatima Agroecology Research Station*  
*Gabriel Carrillo-Bilbao, Víctor Curicama, Roberto Ruiz, Sarah Martin-Solano*

- Biological activity of a new Growth hormone secretagogue: study in fish and murine cell line** 123  
*La actividad biológica de un nuevo secretagogo de la hormona de crecimiento: estudio en el pescado y la línea celular murina*  
*Rebeca Martínez, Katerina Gonzalez, Alain Gonzalez, Kenia Ubieta, Fidel Herrera, Osvaldo Reyes, Hilda Garay, Ayme Oliva, Elsa Rodriguez, Mario Pablo Estrada*

- Terapia celular en la necrosis aséptica de la cabeza del fémur en pacientes con drepanocitosis** 129  
*Cell therapy in aseptic necrosis of the femoral head in patients with sickle cell disease*  
*Aymara Maria Baganet-Cobas, José Armando Galván-Cabrera, Mariela Forrellat-Barrios, Norma D. Fernández-Delgado, Ana Iris González-Iglesias, Consuelo Macías-Abraham, Rosa María Lam-Díaz, Tania González-Suárez, Inés María Tartabull-Matienzo, Porfirio Hernández-Ramírez*

---

## ARTÍCULO DE REVISIÓN

---

**Importancia de los lipopéptidos de *Bacillus subtilis* en el control biológico de enfermedades en cultivos de gran valor económico**

*Importance of Bacillus subtilis lipopeptides in the biological control of diseases in crops of high economic value*

**135**

*Franklin Eduardo Sánchez Pila*

---

**Banco de recursos genéticos de *Auricularia spp.* con fines industriales**

**139**

*Bank of genetic resources Auricularia spp. for industrial purposes*

*Edwin Ortiz, Claudia Soto Arroyave, Carlos Saransi, Klever Ayala, Lucia Faz, Napoleón Benavides, Pablo Vela, Patricia Rosero, William Gómez, José Huaca Pinchao, Gustavo Reyes Lara, Rubén Darío Guzmán Torres, Guillermo Parrado Castro, Stefania Duarte Trujillo, Alejandro Pineda Soto*

---

**Mecanismos de invasión del esporozoíto de *Plasmodium* en el mosquito vector *Anopheles***

**146**

*Mechanisms of invasion from sporozoite of Plasmodium into the mosquito vector Anopheles*

*Lilian M. Spencer, Emiliana Mendoza, Alberto Louro*

---

## NEWS AND VIEWS

---

**El volcán Chimborazo “El Coloso de los Andes”**

**154**

*The volcano Chimborazo “The Colossus of the Andes”*

*Dario Félix Castro Izurieta*



## EDITORIAL

# Contexto actual de los estudios preclínicos

## Current context of preclinical studies

**Dra. Thelvia I. Ramos**

Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura. Ecuador.

**E**l desarrollo acelerado de la Industria Biofarmacéutica, y en particular de la producción de biológicos, ha permitido el incremento de la investigación clínica, teniendo en consideración la novedad de las sustancias que se desarrollan.

El éxito de un producto solo se logra a través de la realización de los estudios clínicos controlados, lo cual significa que este ha sido validado a través de un sistema de gestión de calidad, principal determinante para que la molécula en estudio, pueda ser autorizada y comercializada posterior a la demostración de su seguridad y eficacia. Previo a la presentación de una solicitud para un nuevo producto ante las autoridades regulatorias, es necesario pasar por la etapa de investigación preclínica.<sup>1</sup>

El desarrollo de un producto biotecnológico o una droga en específico, comienza cuando se decide por el patrocinador poner esta molécula en ensayos clínicos Fase I. Para llegar a esta etapa se requiere pasar por los ensayos no-clínicos, los cuales varían desde una prueba de concepto en animales y la demostración concomitante de un posible índice terapéutico (farmacología preclínica y la seguridad / toxicología).<sup>2</sup>

Los estudios preclínicos constituyen una etapa crucial en el desarrollo de nuevas moléculas y terapias. En la actualidad representan un punto álgido en el desarrollo de un producto farmacéutico, concretamente por la evidencia científica que se exige por parte las agencias reguladoras y que se requiere demostrar para el paso de la molécula a una fase clínica.

Refiriéndonos al entorno académico, podemos afirmar que estos estudios representan un elevado costo, y muchas veces existe el desconocimiento de los requisitos mínimos para llevar a cabo este tipo de ensayos, lo cual conlleva a un retraso importante en el desarrollo de terapias susceptibles que puedan pasar a investigación clínica.<sup>3</sup>

Los estudios preclínicos se realizan en animales y modelos fisiológicos en el laboratorio. Los llamados modelos *in vivo*, constituyen sistemas experimentales de gran utilidad en la investigación. Estos diseños en diversas especies de animal posibilitan la aplicación de técnicas de análisis que no pueden emplearse en el hombre por razones éticas. Prometen además investigaciones que no se obtienen mediante técnicas *in vitro* como los cultivos celulares, las cuales tiene la dificultad de que no pueden reproducir las interacciones propias de un sistema biológico completo, tejido u órgano como un todo.<sup>4</sup> En las investigaciones farmacológicas los ensayos con animales de experimentación resultan indispensables para la búsqueda y aplicación de posibles dianas terapéuticas encaminadas tanto a la prevención como al tratamiento de una enfermedad.<sup>5</sup>

Estos ensayos, una vez realizados, permiten medir la eficacia y seguridad de determinado producto ya sea de origen sintético o natural.<sup>6</sup> El propósito primario sigue siendo la evaluación de la actividad biológica. Durante estos estudios el producto diana, por lo general en dependencia del objeto que se persigue, es caracterizado en dos o más especies de animales, debido a que una droga puede afectarlos en forma diferente. Investigadores relacionados con el desarrollo de moléculas, utilizan modelos animales para conocer la fisiopatología y construir prototipos predecibles que emulen con la condición humana, pero no obstante todavía existen muchas limitaciones.<sup>7</sup>

Este tipo de investigación evalúa un gran rango de parámetros de la molécula, e incluyen estabilidad, determinaciones de diversos parámetros en plasma, y otros tipos de tejidos. Se establecen además las propiedades toxicológicas, farmacocinéticas y farmacodinámicas del compuesto. Dentro de estas se destacan los estudios de toxicidad aguda y crónica, toxicidad en dosis repetidas, tolerancia local, inmunogenicidad, carcinogenicidad y sobre el efecto en la reproducción y su progenie. En la última década se le ha dado un impulso importante a los estudios toxicogénicos a través de estos modelos animales.

Los objetivos principales de la evaluación de la seguridad preclínica son: 1) seleccionar una dosis segura inicial y esquemas de escalado de dosis posteriores en los seres humanos; 2) identificar posibles órganos diana para la toxicidad y conocer si el estado de toxicidad presente ante el compuesto es reversible; y 3) identificar los parámetros de seguridad para monitorización clínica. Estos objetivos descritos para los estudios no-clínicos pretenden mejorar la calidad y consistencia de los datos, además de apoyar la seguridad y la eficacia del desarrollo de biofarmacéuticos.<sup>8</sup>

Los estudios preclínicos de seguridad son para definir efectos farmacológicos y toxicológicos no sólo antes de la iniciación de los estudios en humanos, sino en todo el desarrollo clínico. Estos deben tener en cuenta: 1) la selección de las especies animales en cuestión; 2) años de edad; 3) estado fisiológico; 4) la forma de la entrega, incluyendo dosis, vía de administración, y régimen de tratamiento; y 5) la estabilidad del material de ensayo en las condiciones de uso. Se espera que los estudios de toxicidad a realizar tengan cumplimiento de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).<sup>9</sup>

Existe un conocimiento científico que limita de alguna manera la extrapolación de los resultados de los estudios en animales, pues se tratan de sistemas biológicos diferentes aún para los ensayos en modelos de animales humanizados y existen diferencias de respuesta entre especies. El problema principal parece ser la traducción inter-especies para las reacciones adversas inesperadas y eficacia, lo que representa la mayoría de los retiros de dro-

gas y fármacos ya en la fase de ensayo clínico, siendo esta molécula abandonada. De cada diez drogas que salen al mercado cada día, solo una o dos de ellas logran probada seguridad y eficacia, el resto son eliminadas por la presencia de eventos adversos, y los medicamentos que existen en el mercado constituyen opciones más seguras con efectos similares.<sup>10</sup>

Esta alta tasa de desgaste podría reducirse drásticamente mediante la mejora del proceso de pruebas preclínicas, sobre todo teniendo en cuenta las tecnologías recientes, aplicación de biomarcadores subrogados precisos, validados con dianas de toxicidad y eficacia; permitiendo mejorías en el diseño de los proyectos preclínicos para facilitar la recogida e interpretación de la información pertinente de este tipo de estudios, y su extrapolación a la clínica.

Los métodos convencionales para evaluar la toxicidad de los fármacos pueden no ser apropiados para los biofarmacéuticos debido a las propiedades estructurales, biológicas únicas que pueden influir en la especificidad de una especie, la inmunogenicidad y actividades pleiotrópicas imprevistas.<sup>11</sup> Se reconoce además que algunos estudios que emplean sistemas de ensayo especializados necesarios para los productos biofarmacéuticos, puede que no tengan cumplimiento de BPL. Áreas de incumplimiento deben identificarse y evaluarse su importancia en relación con la estimación global de seguridad del producto propuesto.<sup>12</sup>

Las preocupaciones de seguridad pueden derivarse de la presencia de impurezas o contaminantes de los Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA). Es preferible confiar en procesos de purificación para eliminar las impurezas y contaminantes en lugar de establecer un programa de pruebas preclínicas para su calificación. En todos los casos, el producto debe ser suficientemente caracterizado para permitir un diseño apropiado de los estudios preclínicos de seguridad.<sup>13</sup>

Existen riesgos potenciales asociados con contaminantes de la célula huésped derivadas de bacterias, levaduras, insectos, plantas y células de mamíferos. La presencia de contaminantes en el huésped celular puede dar lugar a reacciones alérgicas y otros efectos inmunopatológicos. Los efectos adversos asociados con contaminantes del ácido nucleico son teóricos, sino que incluyen la integración potencial en el genoma del huésped.<sup>13</sup>

Se recomienda en estos estudios cumplimiento de las normativas internacionales para poder establecer la seguridad preclínica y evaluación de productos farmacéuticos derivados de la biotecnología. Los principios activos incluyen proteínas y péptidos, sus derivados y productos de los que forman parte; podrían ser: células caracterizadas mediante el uso de una variedad de sistemas de expresión que incluyen bacterias, levaduras, insectos, plantas y células de mamíferos. También se incluyen variantes de moléculas biotecnológicas que se destacan en los últimos años como es el caso de enzimas, receptores, hormonas, citocinas, factores de crecimiento, activadores de plasminógeno, proteínas terapéuticas y de fusión, y los anticuerpos monoclonales categoría biotecnológica con mayor desarrollo durante los últimos cinco años. Los principios descritos también pueden ser aplicables a la proteína de ADN recombinante vacunas, péptidos sintetizados químicamente, los productos derivados del plasma, proteínas endógenas extraídas a partir de tejido humano, y fármacos de oligonucleótidos.<sup>14</sup>

Durante esta etapa de desarrollo preclínico de una molécula, su patrocinador evalúa los efectos farmacológicos y toxicológicos del producto en estudio a través de técnicas *in vitro*, e *in vivo*, como estas pruebas en animales. Esta etapa experimental incluye la absorción, metabolismo y distribución del fármaco, excreción y su toxicidad, también la velocidad a la que el producto y sus metabolitos se eliminan del cuerpo.

En general, el producto que se utiliza en los estudios farmacológicos y toxicológicos debe ser comparable al producto propuesto para los estudios clínicos iniciales. Sin embargo, se aprecia que durante el transcurso de los programas de desarrollo es habitual que ocurran cambios en el proceso de fabricación con el fin de mejorar la calidad del producto y rendimientos. El impacto potencial de tales cambios para extrapolación de los resultados de los animales a los seres humanos debe ser considerado.

Los productos biofarmacéuticos que sean estructural y farmacológicamente comparable a un producto para el que existe una amplia experiencia en la práctica clínica puede necesitar menos extensas pruebas de toxicidad.

Si estos complejos estudios preliminares son prometedores, puede que el promotor previamente o a partir de estos resultados solicita su patente. Es solo en este momento que se puede considerar la solicitud de un permiso a las agencias reguladoras nacionales e internacionales para desarrollar la droga y comenzar con los estudios en seres humanos, solicitando toda la evidencia documentada sobre el desarrollo del producto (dossier). Una vez concluida esta etapa, se puede evaluar la posibilidad de contar con varias formulaciones incluso para diversas aplicaciones del mismo producto según sus propiedades biológicas, inmunológicas y farmacológicas entre otras. Cada formulación contará con una diversa valoración de sus resultados y permitirá estimaciones farmacológicas más extensas. Estos estudios duran un promedio de 3 a 5 años para un compuesto exitoso, pero sólo 1 de 1.000 compuestos avanza a la siguiente etapa, que comprende a los estudios clínicos en seres humanos.<sup>15</sup>

En la fase preclínica es primordial el conocimiento del ambiente regulatorio y las guías que aplican. Hay que considerar que la investigación ha de ir unida a una simultánea toma de decisiones, que abarcan qué hacer, cuándo hacerlo, cómo y con qué especie animal o con cuantas. Cada droga de manera individual requiere un adecuado desarrollo preclínico que presente la mayor evidencia posible en cuanto a toxicidad y posible eficacia, considerándose el tipo de compuesto, mecanismo de acción para el que fue concebido y las posibles indicaciones clínicas.

Aunque es acertado afirmar que dicha regulación exige que un número importante de pruebas toxicológicas se realicen antes del primer ensayo en humanos, es importante destacar que algunos tipos de ensayos preclínicos no se exigen hasta avanzada las fases clínicas o incluso el registro.

En aras de lograr la armonización para este tipo de estudio a nivel mundial las agencias reguladoras nacionales e internacionales exigen la aplicación de las Guías y Normas de Buenas Prácticas Preclínicas (BPP) (del inglés ICH GUIDELINES ON SAFETY OF ANIMALS). Para el desarrollo y aplicación de los estudios preclínicos en todas las regiones, estas guías permiten adoptar un enfoque flexible, basado en la ciencia para la evaluación preclínica de seguridad. Son necesarias para apoyar el desarrollo clínico de un producto y su posterior autorización y comercialización, con estándares óptimos de calidad. Para los estudios preclínicos en productos biotecnológicos existe una guía específica la S6 (R1) Evaluación de la Seguridad Preclínica a partir de Productos Farmacéuticos obtenidos de la Biotecnología donde su última actualización fue en mayo de 2014.<sup>16</sup> En este número se destaca el auge investigativo tanto en la caracterización de modelos animales, como en la aplicación de estudios preclínicos para diversas especies, motivo por el cual se hace imprescindible que los investigadores conozcan al detalle el desarrollo de esta etapa dentro de la investigación de un producto así como las dificultades que presentan y la normativa y los estándares de calidad que se exigen en este tipo de investigación.



## Referencias bibliográficas

1. Buenas Prácticas de Farmacovigilancia para las Américas. Red PARF Documento Técnico No. 5. Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación Farmacéutica. Washington, DC Diciembre del 2010. OPS.
2. [http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/How-DrugsareDevelopedandApproved/ How Drugs are Developed and Approved](http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/How-DrugsareDevelopedandApproved/How-Drugs-are-Developed-and-Approved). Page Last Updated: 08/18/2015.
3. M. Berger, P. J. Kooyman, M. Makkee, J. S. van der Zee, P. J. Sterk1, J. van Dijk and E. M. Kemper. How to achieve safe, high-quality clinical studies with non-Medicinal Investigational Products? A practical guideline by using intra-bronchial carbon nanoparticles as case study. *Respiratory Research* (2016) 17:102.
4. Field HJ. Animal models in the evaluation of antiviral chemotherapy. Antiviral agents in the development and assessment of antiviral chemotherapy. Boca Ratón: CRC Press, Inc. 1988: 67-84.
5. ICH S6 Guideline: Safety Studies for Biotechnological Products; July 1997.
6. <http://www.medicinabuenaosaires.com/vol56-96/5/animalesdexp.htm>. Universidad de Buenos Aires. Argentina.
7. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL (2007) Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* 7(2):118–130.
8. Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/731268/1998.
9. ICH M3 (R2) Guideline: Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorisation for Pharmaceuticals; June 2009.
10. Liao Y1, Zhang XL, Li L, Shen FM, Zhong MK. Stem cell therapy for bone repair: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies with large animal models. *Br J Clin Pharmacol*. 2014 Oct; 78(4):718-26. doi: 10.1111/bcp.12382.
11. European Commission. Eudralex. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union Volume 4 EU Guidelines to Good Manufacturing Practice, Berger et al. *Respiratory Research* (2016) 17:102 Page 7 of 8 Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Annex 13, Investigational Products. 2010. [ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm)
12. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). ICH Guideline S6 (R1) – Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-derived Pharmaceuticals. Junio del 2011. Doc. Ref. EMA/CHMP/ICH/731268/1998. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500002828.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002828.pdf).
13. Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product. Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Abril del 2015.
14. Assays and strategies for immunogenicity assessment of biological agents. Nencini F, Pratesi S, Petroni G., Matucci A., Maggi E., Vultaggio A. *Drug Dev Res*. Noviembre del 2014;75 Suppl 1:S4-6. doi: 10.1002/ddr.21184
15. DiMasi Joseph A. Risks in new drug development: Approval success rates for investigational drugs. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* (2001) 69, 297–307; doi: 10.1067/mcp.2001.115446.
16. S6(R1) Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals June 2011. PSI Conference 12th May 2014.

## CARTA AL EDITOR

## Ciencias de la vida en la Universidad de Yachay Tech en Ecuador

Graciela Salum<sup>1</sup>, Si Amar Dahoumane<sup>2</sup>, Spiros N. Agathos<sup>3</sup>

La Universidad de Investigación de Tecnología Experimental YACHAY cuenta con más de 900 estudiantes y se encuentra en crecimiento. La universidad ha entrado a una nueva era y ha tomado un paso hacia adelante en su desarrollo y cumplimiento de las esperanzas depositadas en este proyecto. De hecho, sus escuelas han lanzado sus carreras, ofreciendo a los estudiantes una gama amplia de opciones entre los programas de alto nivel académico.

La escuela de Ciencias Biológicas e Ingeniería ha empezado sus dos carreras. La primera denominada "Biología" está dirigida a estudiantes que buscan adquirir conocimientos acerca de "Organismos, Ecología y Evolución" o "Biología Molecular y Celular". La segunda carrera se denomina "Ingeniería Biomédica", este programa es el primero de su clase en Ecuador y está dirigido a estudiantes que desean aplicar principios de Ingeniería y técnicas de resolución de problemas para Biología y Medicina. Estos estudiantes podrán, por una parte, adquirir conocimientos en la interface entre Biología, Medicina y Ciencias Naturales, tales como Física, Química y por otro lado, Ciencias de la Ingeniería tales como Dinámica de Flujo, Informática y Electrónica.

Además de algunos de los conceptos básicos compartidos con la carrera de "Biología", tales como la genética, la histoanatomía, bioquímica y fisiología humana, la carrera de Ingeniería Biomédica es muy rica y versátil, y lleva a dos especializaciones: "Biomecánica y Biomateriales" y "Bioelectrónica y Biomedicina". Estas especializaciones tienen como objetivo formar profesionales altamente calificados con un conocimiento amplio y profundo relacionado con la biomedicina, la salud pública y el bienestar humano. Esto abarca, entre otros, biosensores, nanobiotecnología, implantes, imágenes médicas, dispositivos médicos, herramientas de diagnóstico y biónica.

Los cursos son dictados por profesores altamente cualificados y dedicados, en un ambiente libre de estrés, en nuestro campus en crecimiento que acogerá, dentro de los próximos meses, instrumentación de vanguardia e infraestructura, que, por lo tanto, permite la adquisición por parte de los estudiantes de sólidos conocimientos teóricos que se complementan por medio de prácticas de alto nivel.

Los estudiantes graduados de nuestro programa de "Ingeniería Biomédica" tendrán oportunidades de empleo en las empresas privadas, tales como biofarmacéuticas y spin-offs (o empresas de nueva creación) de biotecnología, pueden formar parte del sector público para trabajar para organismos reguladores y hospitales, o permanecer en la universidad ya sea para trabajar como profesionales en ingeniería o convertirse en investigadores y contribuir en el progreso de la generación de conocimiento e innovación tecnológica.

Apasionado por la biotecnología, interesado en el mejoramiento de la vida humana, acompáñenos y ¡Deje que sus sueños crezcan!

## Life Sciences at the University of Yachay Tech in Ecuador

Yachay Tech University, home for more than 900 students and growing, has entered a new era and made a step forward in its development and fulfillment of the hopes placed on it. Indeed, its Schools have launched their careers offering the students a wide range of choices among programs of high academic level.

The School of Biological Sciences and Engineering has started its two careers. The first one, coined "Biology," is designed for students aiming to gain knowledge either in "Organisms, Ecology and Evolution" or "Molecular and Cellular Biology." The second path, referred to as "Biomedical Engineering", is the first program of its type in Ecuador and is intended for students wishing to apply the principles and problem-solving techniques of Engineering to Biology and Medicine. These students will be able to acquire knowledge at the interface between Biology and Medicine, on one side, and Natural Sciences, such as Physics and Chemistry, and Engineering sciences, such as Flow Dynamics, Informatics and Electronics, on the other side.

Besides some of the fundamentals shared with the "Biology" path, such as genetics, histo-anatomy, biochemistry and human physiology, the Biomedical Engineering career is very rich and versatile, leading to two specializations: "Biomechanics and Biomaterials" and "Bioelectronics and Biomedicine." These specializations aim to train highly skilled professionals with an extensive and intimate knowledge related to biomedicine, public health and human wellness. This encompasses, among others, biosensors, nanobiotechnology, implants, medical imaging, medical devices, diagnostic tools and bionics.

The courses are ensured by highly skilled and dedicated professors in a stress-free environment, in our growing campus, which will host, within the coming months, cutting-edge instrumentation and infrastructure, therefore enabling the acquisition by the students of a very strong theoretical knowledge completed by a practice of very high level.

Students graduating from our "Biomedical Engineering" program will have employment opportunities in private companies, like biopharma and biotechnology spin-offs, can join the public sector to work for regulatory bodies and hospitals, or remain at university to either work as engineering professionals or become researchers and help advance the generation of knowledge and innovative technology.

Excited by biotechnology, interested in the improvement of human life, join us and ¡Let your dreams thrive!

<sup>1</sup>Escuela de Ciencias Físicas e Ingeniería, Yachay Tech. Ecuador.

<sup>2</sup>Escuela de Ciencias Biológicas e Ingeniería, Yachay Tech. Ecuador.

<sup>3</sup>Escuela de Ciencias Biológicas e Ingeniería, Yachay Tech. Ecuador.

## INVESTIGACIÓN

## Evaluación del proteinograma plasmático del cocodrilo Cubano (*Crocodylus rhombifer*)

### Evaluation of plasmatic proteinogram of Cuban crocodile (*Crocodylus rhombifer*)

Vivian Morera<sup>1</sup>, Arline Fernández<sup>2</sup>, Claudia Puentes<sup>2</sup>, Etiam Pérez<sup>3</sup>, Gustavo Sosa<sup>3</sup>, Leiter Guerra<sup>3</sup>, Félix Santana<sup>2</sup> y Yoamel Milian<sup>2</sup>

## RESUMEN

El cocodrilo cubano (*Crocodylus rhombifer*) es una especie endémica de Cuba y en Peligro Crítico de extinción. Con el objetivo de preservar esta especie en la Ciénaga de Zapata, Matanzas, Cuba se mantiene una población en cautiverio. El manejo de una especie en esta categoría tiene como componente esencial el conocimiento del estado de salud de los animales en las diferentes etapas de la vida. El estudio de las proteínas plasmáticas constituye una herramienta eficaz en la clínica veterinaria para determinar la presencia de enfermedades en los cocodrilos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el proteinograma plasmático en cuanto a la concentración total de proteínas en el plasma de *Crocodylus rhombifer* y a las concentraciones de sus fracciones proteicas. Las muestras se tomaron de 35 ejemplares cautivos clínicamente sanos, divididos en dos categorías: juvenil (n=20) y sub-adulto (n=15). Adicionalmente, se tomaron muestras de 8 ejemplares procedentes del medio natural. La concentración total de proteínas en el plasma se determinó mediante el método colorimétrico del ácido bicincolílico. Las proteínas del plasma fueron fraccionadas empleando electroforesis en geles de agarosa y electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico. Mediante espectrometría de masas se identificaron las principales proteínas plasmáticas. La identificación por espectrometría de masas mostró la presencia de albúmina fosforilada en el plasma de los animales. Los valores de concentración total de proteínas y de albúmina fueron mayores en los animales cautivos que en los de medio natural, siendo más altos los de la categoría sub-adulto. Contrariamente, las  $\gamma$  globulinas presentaron mayores valores de concentración en los animales procedentes del medio natural. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de las fracciones proteicas entre animales en las distintas etapas del desarrollo. En la categoría juvenil la fracción  $\beta$  globulina mostró mayor concentración y la fracción  $\gamma$  la menor concentración. Lo opuesto fue encontrado para la categoría sub-adulto. Los resultados de este estudio constituyen el primer informe sobre el proteinograma plasmático de *Crocodylus rhombifer* en cautiverio y aportan una herramienta bioquímica para contribuir al manejo adecuado de esta especie en cautiverio.

**Palabras clave:** *Crocodylus rhombifer*, proteinograma, proteínas, plasma.

## ABSTRACT

Cuban crocodile (*Crocodylus rhombifer*) is an endemic and critically endangered species. In order to preserve this species a population of them is maintained in captivity in the farm "Zapata Swamp", Matanzas, Cuba. To manage such species, the knowledge of the animal health status, in different stages of live, is an essential component. The plasmatic proteinogram is an effective tool in veterinary medicine to determine the presence of diseases in crocodiles. The goal of this thesis was the evaluation of the plasmatic proteinogram, taking into account the total protein concentration and the relationship between its fractions. Samples were taken from clinically healthy 35 captive animals, divided in two categories: juveniles (n=20) and sub-adults (n=15) and additionally 8 animals from the natural environment. The total protein concentration was determined using bincincolilic acid method. The plasma proteins were separated using electrophoresis on agarose gels and polyacrylamide gels. By mass spectrometry were identified the main plasmatic proteins. The identification by mass spectrometry showed the presence of phosphorylated albumin. The values of total protein concentration and albumin were higher in captive animal, being the highest those corresponding to sub-adults. Contrarily, the  $\gamma$  globulins fraction was higher in wild animals. For animals with different development stages no significant difference were found. In juveniles,  $\beta$  fraction was higher and  $\gamma$  fraction was lower. In sub-adults, the opposite was found. The results of this thesis are the first report concerning the characterization of plasmatic proteinogram of *Crocodylus rhombifer* in captivity.

**Keywords:** *Crocodylus rhombifer*, proteinogram, proteins, plasma.

<sup>1</sup> Universidad de Las Américas, Quito, Ecuador.

<sup>2</sup> Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.

<sup>3</sup> Criadero Ciénaga de Zapata. Matanzas, Cuba.

**Autor de correspondencia:** Vivian Morera. 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. Teléf. (593) 23981000 Ext. 112. Correo electrónico: vivian.morera@udla.edu.ec



## Introducción

El *Crocodylus rhombifer*<sup>1</sup> es una especie endémica de Cuba y la más amenazada dentro de la familia Crocodylidae. Su distribución en el archipiélago cubano está limitada a 300 km<sup>2</sup> en la Ciénaga de Zapata, Matanzas y a 100 km<sup>2</sup> en la Ciénaga de Lanier, Isla de la Juventud. Las principales amenazas a esta especie son la caza indiscriminada, la destrucción de su hábitat natural y la hibridación con *Crocodylus acutus*<sup>2</sup>. *Crocodylus rhombifer* es un miembro clave de la herpetofauna cubana para la conservación del principal humedal cubano: la Ciénaga de Zapata. Esto se debe a que mantiene la estructura dinámica y la función del ecosistema porque realiza actividades como la depredación selectiva de especies de peces, el reciclamiento de nutrientes y el mantenimiento de refugios con agua durante las sequías<sup>3</sup>. Esta especie está incluida en el apéndice I por la Convención Internacional para el Comercio de Flora y Fauna Silvestres (CITES) y en el Libro Rojo de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (UICN) bajo la categoría de especie En Peligro Crítico de Extinción<sup>4</sup>. Una alternativa para el mantenimiento de una especie cuando las poblaciones naturales están casi agotadas es su reproducción en cautiverio, es decir animales nacidos y levantados exclusivamente en un medio controlado, donde el criador les suministra un espacio idóneo, alimento, limpieza, cuidado sanitario y protección contra la depredación.

El manejo en cautiverio de una especie en peligro de extinción requiere el conocimiento de la situación de salud de los animales. Los cocodrilos enfermos en condiciones de cautiverio muestran signos clínicos inespecíficos lo que hace difícil identificar su estado y predecir la aparición de enfermedades por simple observación. Por otra parte, al ser animales ectotermos y variar su temperatura corporal en la misma dirección que la temperatura ambiental, la medición de esta no puede ser empleada como una herramienta clínica. Sin embargo, algunos parámetros bioquímicos de la sangre como las proteínas plasmáticas constituyen una valiosa ayuda en el diagnóstico de ciertas enfermedades<sup>(5,6)</sup>. Esto se debe a que las proteínas plasmáticas tienen funciones importantes como el mantenimiento de la presión osmótica, el equilibrio ácido-base, el transporte de metabolitos como los lípidos y las hormonas y algunas de ellas juegan un papel importante en la defensa del organismo frente a patógenos. Es por ello que la medición de estas proteínas refleja el estado de salud de los individuos<sup>7</sup>.

La electroforesis de proteínas es actualmente la técnica de referencia para el fraccionamiento de las proteínas del plasma. Aun cuando su especificidad diagnóstica es baja, los resultados de la electroforesis de las proteínas plasmáticas constituyen una herramienta útil en Clínica. En particular, la electroforesis nativa de las proteínas del plasma en geles de agarosa es una de las técnicas más empleadas por su buena resolución, reproducibilidad y claridad de las bandas. En este tipo de electroforesis las proteínas son separadas en función de su carga ya que el tamaño del poro es tan grande que el gel no ejerce la función de tamizaje en virtud del tamaño molecular. De esta manera, las proteínas del plasma pueden ser fraccionadas en las cinco bandas clásicas correspondientes a albúmina, seguida de varias bandas de globulinas denotadas consecutivamente como  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  globulinas<sup>8</sup>.

La información relacionada con el proteinograma plasmático para la especie *Crocodylus rhombifer* resulta inexistente. El propósito de este estudio fue determinar los valores de concentración total de proteínas del plasma y de sus diferentes fracciones para *Crocodylus rhombifer* y establecer las posibles diferencias atribuibles a la etapa del desarrollo.

## Métodos

### Animales y muestras

Se emplearon 35 ejemplares de *Crocodylus rhombifer* mantenidos en cautiverio en el criadero "Ciénaga de Zapata", Matanzas,

Cuba y 8 ejemplares del medio natural. Los animales provenientes del medio natural fueron capturados en la región y trasladados al criadero para su estudio. Los animales mantenidos en cautiverio fueron alimentados una vez por semana con desperdicios de ganado vacuno. El estado de salud aparente se evaluó por observación del estado general, la vivacidad, el dinamismo, el apetito, la coloración de la piel y las mucosas, así como la ausencia de lesiones externas. Los cocodrilos fueron capturados manualmente con la ayuda de una cuerda sin utilizar narcóticos o tranquilizantes. La extracción de sangre se realizó por punción cardíaca y se tomó 5 mL de cada animal. Las muestras se colectaron empleando jeringas estándar de 10 mL humectadas con EDTA 0.05 mol/L y se almacenaron en tubos Vacutainer que contenían EDTA como anticoagulante (VACUETTE® K3E K3EDTA, Greiner Bio-one GmbH, Austria). Durante el muestreo la sangre se mantuvo en un termo con hielo. El plasma se obtuvo por centrifugación a 2000 g durante 15 min a 4°C en una centrifuga Sigma (Alemania). Este se conservó a -20°C hasta el momento de los análisis.

### Determinación de la concentración total de proteínas

La concentración total de proteínas en el plasma de cada animal se determinó mediante la técnica colorimétrica del ácido bicinónico (BCA). Se empleó el protocolo en placas de 96 pozos del juego de reactivos "Ensayo de Proteínas BCA" (Thermo Scientific, EUA). Para la realización de este ensayo se utilizó como proteína patrón la albúmina bovina de suero (BSA) y se realizaron diluciones seriadas a diferente concentración en el rango de 125-1500  $\mu\text{g/mL}$ . Las determinaciones se realizaron por triplicado. Como control positivo del ensayo se empleó la proteína patrón diluida con agua 1:2 (v:v). La lectura se realizó a 540 nm en un lector de placas (Merck Sensident Scan, Finlandia).

### Electroforesis en geles de agarosa

Se utilizó como soporte electroforético agarosa para proteínas plasmáticas (Biozym ME agarose, Biozym, Alemania). El gel se preparó al 2% en tampón de corrida. El tampón de corrida fue tris-ácido bórico 90 mmol/L, pH 8.5. La solución tampón de muestra consistió en glicerol al 30% conteniendo 0.0005g de bromofenol azul. La corrida se realizó con el gel sumergido en solución de corrida en una cámara horizontal durante 75 minutos; se aplicó un voltaje de 100 Volt. La fijación se realizó durante 15 min con una solución de etanol, ácido acético y agua destilada (1:6:3, v:v:v). Los geles se tiñeron utilizando una solución de Negro amida. La solución de distinción contenía ácido acético glacial, etanol absoluto y agua destilada (1:4.5:4.5, v:v:v); el tiempo de distinción fue de aproximadamente 24 horas.

### Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico se realizó en geles al 10% y con el protocolo básico de Laemmli<sup>9</sup>. Para las corridas se utilizó una cámara Mini-Protean II (Bio-Rad, EUA) y una corriente de 30 mA generada con una fuente (Farmacia, Suecia). Las muestras se mezclaron con tampón de desnaturalización 2x: 0.125 mol/L Tris-HCL, SDS al 2%, glicerol al 25%, gotas de bromofenol azul y  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%, pH 6.8 y se calentaron a 100°C durante 5 min en un baño de arena (Thermolyne, EUA). Luego de la corrida los geles se colocaron en la solución de fijación compuesta por ácido acético al 10%, etanol al 40% y agua destilada al 50%. Para la tinción de los geles se utilizó una solución coloidal de Coomassie azul brillante G-250 al 0,1%, ácido ortofosfórico al 2% y sulfato de amonio al 10%. Los geles se decoloraron mediante lavados con agua destilada. Se utilizó un patrón comercial de bajas masas moleculares (Bio-Rad, EUA). Para la identificación de las proteínas mayoritarias del plasma mediante espectrometría de masas los geles se tiñeron con plata<sup>10</sup>.

## Determinación de la concentración total de proteínas de las fracciones obtenidas mediante electroforesis

La determinación de la concentración total de proteínas de las fracciones separadas mediante electroforesis en gel de agarosa se realizó utilizando el programa TotalLab versión 1.10 (EUA). Este programa permite la selección del área coloreada de cada fracción y calcula el porcentaje que representa cada una del total de fracciones en la carrilera. Con estos datos se calcula la concentración total de proteínas en cada fracción utilizando la siguiente fórmula:

donde C, es la concentración total de proteína en cada banda; CBCA, es la concentración total de proteínas en el plasma antes del fraccionamiento mediante electroforesis y determinada por el método colorimétrico del BCA y % banda, es el porcentaje obtenido con el programa TotalLab versión 1.10 (EUA).

## Digestión de proteínas en el gel

Los fragmentos de gel, directamente obtenidos de la SDS-PAGE, se lavaron 3 veces con agua durante 10 min cada vez. Posteriormente, se cortaron en cubos de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup> y se deshidrataron con 1 mL de acetonitrilo al 90% con agitación durante 5 min. Después de retirada la solución, las muestras se secaron 5 min en una centrifuga concentradora al vacío y se rehidrataron con una solución de tripsina a 12.5 ng/mL en bicarbonato de amonio 0,05 mol/L. Se digirió durante 16 h a 37°C. Los péptidos tripticos se desalaron en micro columnas ZipTips C18 activadas con una solución de acetonitrilo al 60%, ácido fórmico al 1% y equilibradas con una solución de ácido fórmico al 1%. La mezcla de péptidos se eluyó con 3 µL de una solución de acetonitrilo al 60%, ácido fórmico al 1%.

## Espectrometría de masas

Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de masas híbrido con geometría ortogonal QTOF-1 TM (Micromass, Reino Unido) equipado con fuente de ionización por electronebulización Z-spray. El capilar de entrada se sometió a 1200 V y el voltaje del cono fue de 35 V. El analizador se calibró usando yoduro de sodio y cesio como referencia, en el rango de

m/z de 50 a 2000 Th. Para la obtención de espectros MS/MS de señales mono, doble y triple cargadas cuyas intensidades en el espectro ESI-MS sobrepasaran 15 conteos/segundos, se empleó una ventana de detección de 4 Th. La energía de colisión para la fragmentación fue previamente definida tomando en consideración el estado de carga. La identificación de proteínas basada en los espectros MS/MS, se realizó empleando el programa MASCOT<sup>11</sup> y la base de datos UniProtKB<sup>12</sup>.

## Análisis estadístico

Se comprobó la normalidad de los datos mediante una prueba Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza mediante una prueba Levene. Se calcularon los valores de media, desviación estándar, intervalo de confianza y mínimo-máximo de la: concentración total de proteínas en plasma, de albúmina, de α1 globulinas, de α2 globulinas, de β globulinas, de γ globulinas, de globulinas totales y la relación albúmina-globulinas para los tres grupos estudiados. Se realizó una prueba t de Student para comparar la concentración de: proteínas en plasma, albúmina, α1 globulinas, α2 globulinas, β globulinas, γ globulinas, de globulinas totales y la relación albúmina-globulinas de acuerdo a etapa del desarrollo. Todos los cálculos fueron realizados con el programa Statistic versión 8.0 (StatSoftInk) teniendo en cuenta un grado de significación p < 0.05 y los intervalos de confianza del 95%.

## Resultados

La clasificación de los animales por categorías se realizó teniendo en cuenta los parámetros establecidos por los especialistas del criadero. Ellos consideran los valores de largo total como puntos de corte: categoría juvenil, entre 60 y 149 cm, categoría sub-adulto, entre 150 y 179 cm y categoría adulto mayores de 180 cm. El sexo de los animales se determinó mediante examinación manual (Fig. 1). De los animales cautivos, 20 clasificaron en la categoría juvenil. De ellos, 17 animales resultaron hembras y 3 machos. En la categoría sub-adulto clasificaron 15 animales, de ellos 13 resultaron hembras y 2 machos. De los animales provenientes del medio natural, 1 ejemplar clasificó como juvenil, 4 como sub-adultos y 3 como adultos. En este grupo 7 animales eran machos y 1 hembra.



Fig. 1. Determinación del sexo de los animales (izquierda). Los animales machos se distinguen por la presencia de un pene que se palpa fácilmente (derecha).

Para la población global en cautiverio el valor promedio de concentración total de proteínas en el plasma fue de 5.41 g/dL y los valores oscilaron entre 3.53 y 7.53 g/dL. En el grupo de animales cautivos con categoría juvenil el valor promedio de concentración total de proteínas en el plasma fue de 5.30 g/dL y los valores oscilaron entre 4.24 y 7.18 g/dL. Para los animales cautivos con categoría sub-adulto el valor promedio de concentración total de proteínas en el plasma fue de 5.55 g/dL y los valores oscilaron entre 3.53 y 7.53 g/dL. Los animales del medio natural presentaron un valor promedio de concentración total de proteínas en el plasma de 4.89 g/dL, y los valores oscilaron entre 2.30 y 6.91 g/dL (Tabla 1). Para evaluar la variabilidad de la concentración total de proteínas en el plasma en cuanto a etapa del desarrollo y a procedencia se aplicaron pruebas t de Student. Para ello se compararon los grupos de animales cautivos con categoría juvenil y sub-adulto, y los grupos de animales cautivos con categoría sub-adulto y los animales procedentes del medio natural, respectivamente. Ambos análisis revelaron la presencia de diferencias no significativas entre los grupos comparados ( $p > 0.05$ ).

El perfil típico del proteinograma plasmático obtenido para *Crocodylus rhombifer* en gel de agarosa al 2% mostró 6 fracciones proteicas. En el perfil electroforético la albúmina se identificó por su cercana migración a la de una muestra de albúmina bovina de suero, aplicada en el gel como referencia de masa molecular (resultados no mostrados). La banda que migró más próxima al ánodo se asignó a albúmina fosforilada (Fig. 2). Esta asignación fue posible tras el análisis de una muestra de plasma tratada con agentes reductores mediante SDS-PAGE, seguido de la digestión proteolítica con tripsina de las principales bandas de proteínas y el análisis de los péptidos por espectrometría de masas en sucesión (EM-MS/MS) (Fig. 3). La identificación de las proteínas plasmáticas mayoritarias se basó en las secuencias de los péptidos tripticos obtenidas a partir de los espectros MS/MS (Tabla 2). Las bandas 1-5 correspondieron a la  $\alpha 2$  macroglobulina, la transferrina, la cadena pesada de la inmunoglobulina y la albúmina sérica, respectivamente. Todas las proteínas fueron identificadas con más de un péptido y el porcentaje de homología entre las secuencias obtenidas en este trabajo y las secuencias homólogas informadas en la base de datos resultó superior al 64% (Tabla 2). Las secuencias homólogas, en todos los casos, correspondieron a especies del Orden Crocodylia. La cadena pesada de la inmunoglobulina y la albúmina sérica fueron identificadas en las bandas 4 y 5, con un total de 9 y 6 péptidos, respectivamente. De ellos, 3 resultaron péptidos fosforilados. La diferencia de masas de 80 Da entre la señal m/z del ion precursor (1678.66 m/z) y la señal del primer fragmento obtenido (1598.83 m/z) sugiere la presencia en esa secuencia de un aminoácido fosforilado (Tabla 2, Fig. 3).

La determinación de la concentración total de proteínas de cada fracción obtenida mediante electroforesis en gel de agarosa se realizó por análisis densitométrico. A partir del porcentaje que representó cada fracción en el porcentaje total de las fracciones en la carrilera se determinó la concentración de cada una. El valor de albúmina se consideró como la suma de las fracciones correspondientes a la albúmina nativa y la albúmina fosforilada. Para la población global de animales en cautiverio ( $n=35$ ) se obtuvo un valor promedio de la concentración total de proteínas por fracción de: albúmina 1.95 g/dL,  $\alpha 1$  globulinas 0.68 g/dL,  $\alpha 2$  globulinas 0.37 g/dL,  $\beta$  globulinas 0.91 g/dL y  $\gamma$  globulinas 1.49 g/dL. El valor promedio de globulinas totales resultó 3.46 g/dL y la relación albúmina-globulinas 0.56. Para el grupo de animales del medio natural ( $n=8$ ) se obtuvo un valor promedio de la concentración total de proteínas por fracción de: albúmina 1.50 g/dL,  $\alpha 1$  globulinas 0.54 g/dL,  $\alpha 2$  globulinas 0.38 g/dL,  $\beta$  globulinas 0.71 g/dL y  $\gamma$  globulinas 1.70 g/dL. El valor promedio de globulinas totales y de la relación albúmina-globulinas resultó 3.39 g/dL y 0.44, respectivamente (Tabla 3).

Para el grupo de animales cautivos con categoría juvenil ( $n=20$ ) se obtuvo un valor promedio de la concentración total de proteínas por fracción de: albúmina 1.86 g/dL,  $\alpha 1$  globulinas 0.67 g/dL,  $\alpha 2$  globulinas 0.37 g/dL,  $\beta$  globulinas 0.95 g/dL y  $\gamma$  globulinas 1.44 g/dL. El valor promedio de globulinas totales y de la relación albúmina-globulinas resultó 3.44 g/dL y 0.54, respectivamente. Para el grupo de animales cautivos con categoría sub-adulto ( $n=15$ ) se obtuvo un valor promedio de la concentración total de proteínas por fracción de: albúmina 2.07 g/dL,  $\alpha 1$  globulinas 0.69 g/dL,  $\alpha 2$  globulinas 0.37 g/dL,  $\beta$  globulinas 0.86 g/dL y  $\gamma$  globulinas 1.56 g/dL. El valor promedio de globulinas totales y de la relación albúmina-globulinas resultó 3.48 g/dL y 0.60, respectivamente (Tabla 4).

La comparación de la concentración total de proteínas de las fracciones proteicas separadas mediante electroforesis en geles de agarosa se realizó mediante un ANOVA de clasificación simple y se compararon los grupos de animales cautivos con categoría juvenil, animales cautivos con categoría sub-adulto y los animales procedentes del medio natural. Se observó que el mayor valor de albúmina correspondió a los animales cautivos con categoría sub-adulto, mientras que el menor valor de esta proteína correspondió a los animales del medio natural. El ANOVA reveló que las diferencias en la concentración de albúmina son significativas ( $F= 4.99$  y  $p= 0.01$ ). Por otra parte, se observó que el valor de relación albúmina-globulinas es mayor para el grupo de animales cautivos con categoría sub-adulto. El menor valor de esta variable se obtuvo para los animales procedentes del medio natural. El ANOVA reveló que las diferencias entre los valores de relación albúmina-globulinas para los tres grupos son altamente significativas ( $F= 10.96$  y  $p= 0.0001$ ).

**Tabla 1.** Concentración total de proteínas en el plasma de *Crocodylus rhombifer* determinada mediante la técnica colorimétrica del BCA.

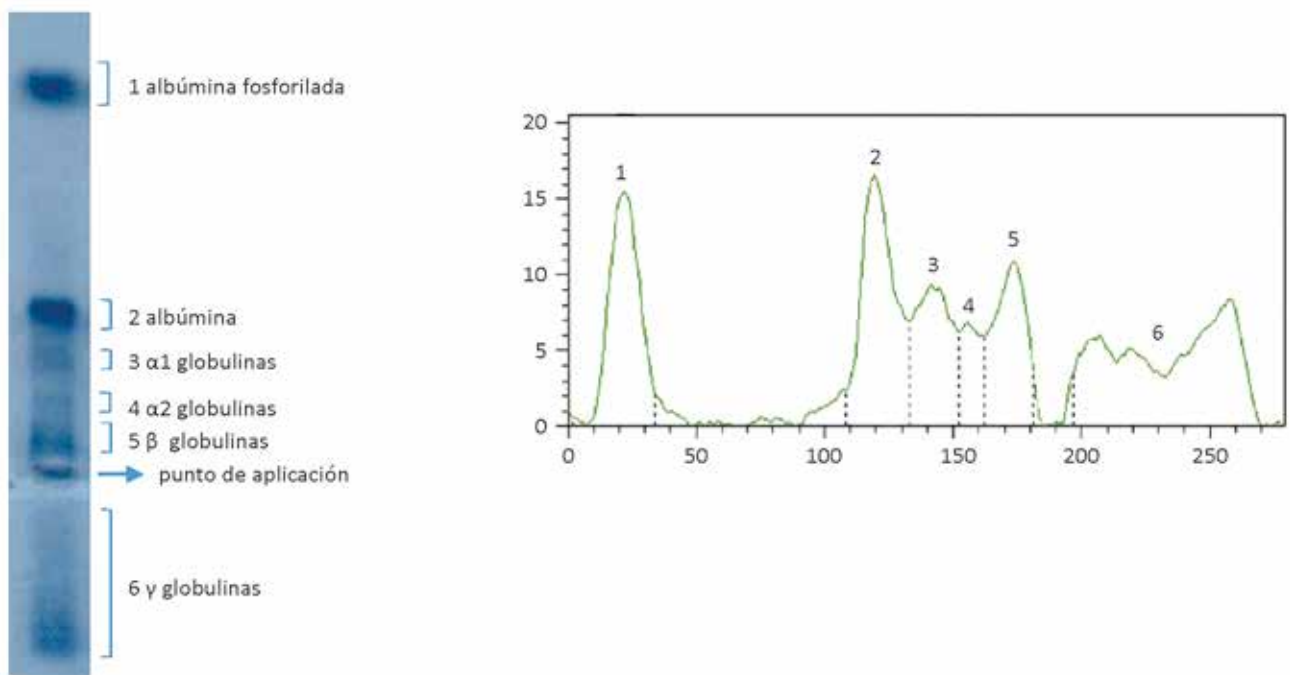
Procedencia de los animales Categoría	Concentración total de proteínas en el plasma (g/dL)			
	Promedio	DS	IC $\pm$ 95%	Rango
<b>Cautiverio población global (n=35)</b>	5.41	0.92	5.09-5.72	3.53-7.53
<b>Cautiverio juvenil (n=20)</b>	5.30	0.73	4.24-7.18	4.24-7.18
<b>Cautiverio sub-adulto (n=15)</b>	5.55	1.13	4.92-6.17	3.53-7.53
<b>Medio natural (n=8)</b>	4.89	1.67	3.49-6.29	2.30-6.91

DS –desviación estándar.

IC – intervalo de confianza.

n – número de individuos.





**Fig. 2.** Separación de las proteínas plasmáticas mediante electroforesis en gel de agarosa y análisis de las fracciones proteicas por densitometría. A. Perfil electroforético en gel de agarosa al 2% del plasma de *Crocodylus rhombifer*. B. El trazado obtenido por densitometría indica los picos en correspondencia con cada una de las fracciones separadas: 1 – albúmina fosforilada, 2 – albúmina, 3 – α1 globulinas, 4 – α2 globulinas, 5 – β globulinas y 6 – γ globulinas.

**Tabla 2.** Resumen de la identificación de las proteínas plasmáticas mayoritarias de *Crocodylus rhombifer* basada en los espectros MS/MS. En rojo se destacan las diferencias puntuales encontradas entre las secuencias obtenidas en este trabajo y las secuencias informadas en la base de datos UniProtKB\*. En negritas se destacan las secuencias correspondientes a péptidos fosforilados, encontrados en este trabajo

Banda del gel	Señal m/z	Secuencia obtenida	Homología entre las secuencias (%)	Organismo	Proteína
		Secuencia homóloga			
1	606.81	AVGYLVSGYQR	100	En estudio	<i>Alpha-2-macroglobulin like</i>
		AVGYLVSGYQR		<i>Alligator sinensis</i>	
	688.35	FPLVIQDPQR	91	En estudio	
		FPLAYIQDPQR		<i>Alligator sinensis</i>	
	697.34	QNTFYLVMSK	82	En estudio	
		<b>E I</b> TFYLVMSK		<i>Alligator sinensis</i>	
	713.37	HIQDAQWLSSK	100	En estudio	
		HIQDAQWLSSK		<i>Alligator sinensis</i>	
	822.97	TAVAFLSVLVEGPTLK	81	En estudio	
		TAEAFSLVKGLTLK		<i>Alligator sinensis</i>	
825.77	...LSASSVYLLPLK	100	En estudio		
	...LSASSVYLLPLK		<i>Alligator sinensis</i>		
1067.91	...DDEVTL SAYITIALLEI...	100	En estudio		
	...DDEVTL SAYITIALLEI...		<i>Alligator sinensis</i>		
2	723.37	...TADLATASQIVR	100	En estudio	
		...TADLATASQIVR		<i>Alligator sinensis</i>	
	892.92	...AVTDGGFVYTAGR	100	En estudio	
		...AVTDGGFVYTAGR		<i>Crocodylus niloticus</i>	
3	867.91	...IWNFLNEVQEK	100	En estudio	
		...IWNFLNEVQEK		<i>Crocodylus niloticus</i>	
	642.29	EYDTSVTNLNK	82	En estudio	
		EHTDPVTNLNK		<i>Crocodylus niloticus</i>	Transferrin

Tabla 2. Continuación

Banda del gel	Señal m/z	Secuencia obtenida	Homología entre las secuencias (%)	Organismo	Proteína	
4	1062.49	...PVMEEEGDSSFFLYSK	100	En estudio	Membrane-bound immunoglobulin epsilon heavy chain	
		...PVMEEEGDSSFFLYSK		<i>Crocodylus siamensis</i>		
	951.42	...SPMELNAYVTTP...	100	En estudio		
		...SPMELNAYVTTP...		<i>Crocodylus siamensis</i>		
	854.08	ILSVAWLVDGSTQHI...	100	En estudio		
		ILSVAWLVDGSTQHI...		<i>Crocodylus siamensis</i>		
	672.98	APETYLLGPH...	100	En estudio		
		APETYLLGPH...		<i>Crocodylus siamensis</i>		
	697.91	VALITFAQYLQK	100	En estudio		Serum Albumin like
		VALITFAQYLQK		<i>Alligator sinensis</i>		
	677.38	ENQLGLLVNLIK	92	En estudio		
		ENQLKLLVNLIK		<i>Alligator sinensis</i>		
	951.42	...SPMELNAYVTTP...	100	En estudio		
		...SPMELNAYVTTP...		<i>Crocodylus siamensis</i>		
854.08	ILSVAWLVDGSTQHI...	100	En estudio			
	ILSVAWLVDGSTQHI...		<i>Crocodylus siamensis</i>			
1040.19	...YTTSTQLTIPAGSLSS-QAYS... (fosforilado)	100	En estudio			
	...YTTSTQLTIPAGSLSSQAYS...		<i>Crocodylus siamensis</i>			
5	912.97	<b>QVQGCLPQXXXP-LLR (fosforilado)</b>	85	En estudio		
		QVQGCLPQPPQPPTVR		<i>Crocodylus siamensis</i>		
	605.84	...PLGGTAPTVR	100	En estudio		
		...PLGGTAPTVR		<i>Crocodylus siamensis</i>		
	697.91	VALITFAQYLQK	100	En estudio	Serum Albumin like	
		VALITFAQYLQK		<i>Alligator sinensis</i>		
	677.38	ENQLGLLVNLIK	100	En estudio		
		ENQLKLLVNLIK		<i>Alligator sinensis</i>		
839.90	QVYACGILDQFT-LK (fosforilado)	100	En estudio			
	QVYACGILKKFGER		<i>Alligator sinensis</i>			
779.94	MPQVSTQTLEIAK	100	En estudio			
	MPQVSTETLLEITK		<i>Alligator sinensis</i>			

m/z – relación masa-carga del ión

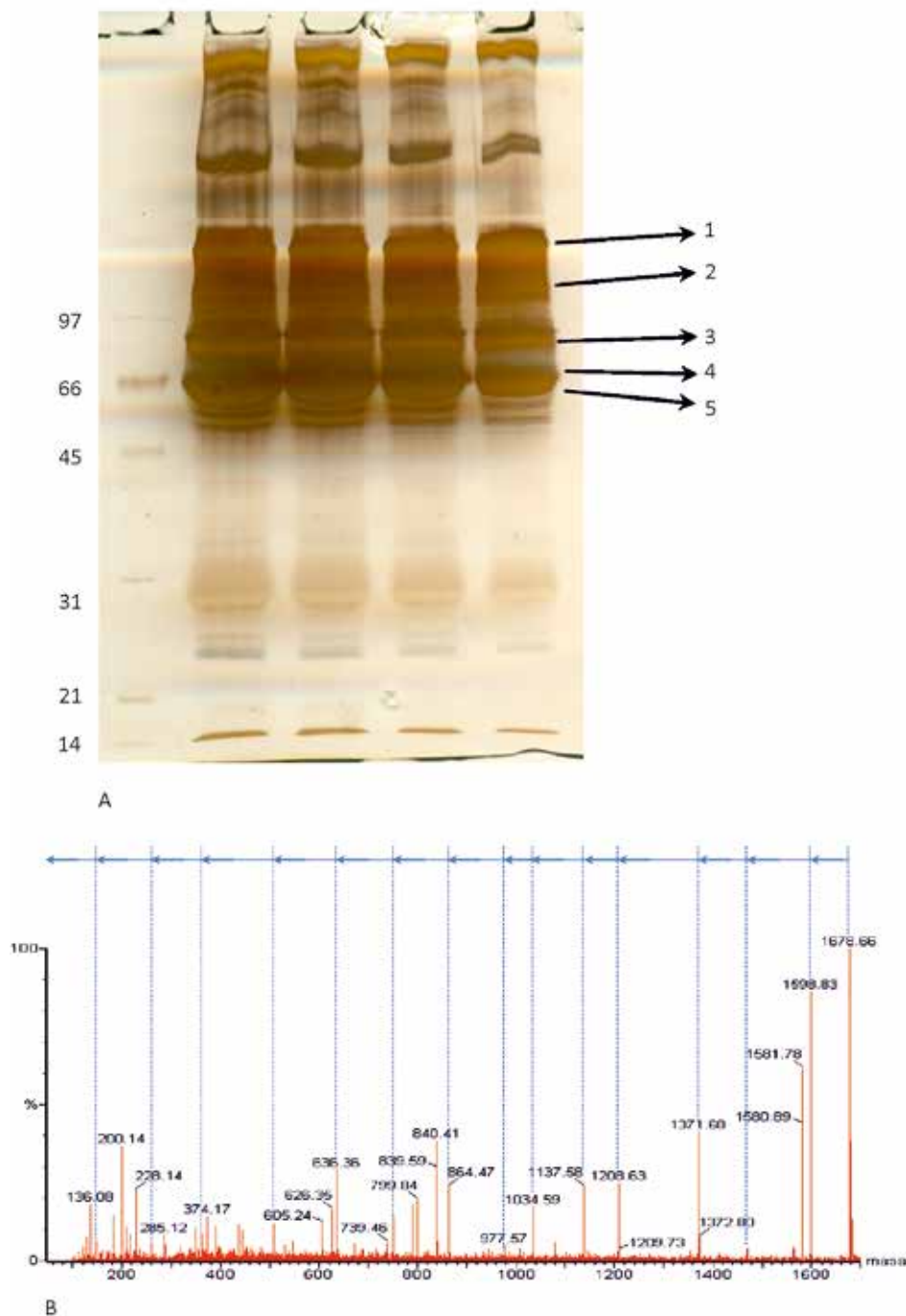
XXX– aminoácidos no identificados en el espectro MS/MS

\*<http://www.uniprot.org>

La concentración de globulinas totales no demostró variaciones significativas entre los grupos comparados ( $p=0.96$ ). Las fracciones  $\alpha 1$  globulinas,  $\alpha 2$  globulinas y  $\gamma$  globulinas no mostraron diferencias entre los grupos ( $p>0.05$ ). El mayor valor de la fracción de las  $\gamma$  globulinas se observó en los animales del medio natural y el menor valor para el grupo de animales cautivos con categoría juvenil. La fracción correspondiente a las  $\beta$  globulinas mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F= 3.79$  y  $p= 0.03$ ); el mayor valor de esta fracción correspondió al grupo de animales cautivos con categoría juvenil y el menor valor a los animales del medio natural.

## Discusión

Las proteínas plasmáticas están involucradas en casi todos los procesos biológicos vitales por lo que el estudio del proteograma plasmático resulta útil en la evaluación del estado de salud o enfermedad, así como del estado nutricional de muchas especies. La medición de estas proteínas se emplea para diferenciar los estados de enfermedad agudos de estados crónicos<sup>13</sup>. En este trabajo se determinó la concentración total de proteínas plasmáticas y de sus fracciones para una muestra de la población cautiva de *Crocodylus rhombifer* del criadero “Ciénaga de Zapata”,



**Fig. 3.** Fraccionamiento de las proteínas plasmáticas mayoritarias mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico e identificación mediante espectrometría de masas en sucesión.

A: perfil electroforético de una muestra de plasma de *Crocodylus rhombifer* en SDS-PAGE al 10%. En la carrilera de la extrema izquierda se aplicó el patrón de peso molecular: 97 kDa fosforilasa b, 66kDa albúmina sérica, 45 kDa ovoalbúmina, 31 kDa anhidrasa carbónica, 21 kDa inhibidor de tripsina y 14 kDa lisozima. A continuación, de izquierda a derecha se aplicaron 5, 4, 3 y 2  $\mu$ L de plasma diluido 1 en 5. Las bandas identificadas con los números del 1 al 5 se digirieron con tripsina y se analizaron por EM-MS/MS.

B: espectro de masas MS/MS del péptido fosforilado correspondiente a la secuencia QVYACGILDQFTLK de la albúmina sérica identificada en la banda 5. Se emplea el código de una letra para identificar a los  $\alpha$ -aminoácidos.

Matanzas, Cuba. Los resultados obtenidos se compararon con un grupo de animales procedentes del medio natural. Las variaciones eventuales debido al efecto postprandial y el ritmo circadiano que pudieran registrarse en la concentración total de proteínas fueron excluidas del diseño experimental debido a que la toma de las muestras se realizó en horas tempranas de la mañana y en ayuno.

El rango de valores de concentración total de proteínas plasmáticas para la población cautiva estudiada de *Crocodylus rhombifer*, así como el valor experimental promedio obtenido están dentro del rango de valores informado para la clase Reptilia<sup>14</sup>. Aun que casi todas las especies de reptiles estudiadas se encuen-

tran dentro de este rango, es posible observar variaciones entre órdenes, familias, géneros, especies e incluso individuos de una misma especie<sup>15</sup>. En la tabla 5 aparecen los valores de concentración total de proteínas, albúmina, globulinas totales y relación albúmina-globulinas para algunas especies que pertenecen al Orden Crocodylia, específicamente de las familias *Alligatoridae* y *Crocodylidae*. La variabilidad y los amplios rangos de estos valores pueden ser atribuidos a las particularidades fisiológicas de los reptiles ya que los parámetros sanguíneos fluctúan considerablemente en función del sistema de alimentación, el hábitat, el clima, el sexo y la edad (<sup>16-19</sup>).



**Tabla 3.** Valores promedio de la concentración total de proteínas de las fracciones separadas mediante electroforesis en geles de agarosa de *Crocodylus rhombifer* para la población global en cautiverio (n=35) y los animales del medio natural (n=8)

Procedencia	Cautiverio (n=35)				Medio natural (n=8)			
	Prom.	DS	IC ± 95%	Rango	Prom.	DS	IC ± 95%	Rango
albúmina* (g/dL)	1.95	0.40	1.81-2.08	1.30-3.21	1.50	0.51	1.07-1.93	0.68-2.07
α1 globulinas (g/dL)	0.68	0.14	0.63-0.73	0.44-0.98	0.54	0.21	0.37-0.71	0.26-0.82
α2 globulinas (g/dL)	0.37	0.08	0.35-0.40	0.23-0.53	0.38	0.15	0.25-0.50	0.13-0.53
β globulinas (g/dL)	0.91	0.21	0.84-0.98	0.55-1.47	0.71	0.27	0.48-0.93	0.31-0.98
γ globulinas (g/dL)	1.49	0.39	1.36-1.63	0.84-2.61	1.70	0.72	1.09-2.30	0.34-2.59
GT (g/dL)	3.46	0.62	3.25-3.67	2.23-5.10	3.39	1.14	2.44-4.35	1.72-4.84
RAG	0.57	0.09	0.54-0.60	0.32-0.77	0.44	0.03	0.41-0.47	0.39-0.48

\* Albúmina: se informa como la suma de las fracciones correspondientes a la albúmina nativa y la albúmina fosforilada.

Prom. - valor promedio.

DS - desviación estándar.

IC - intervalo de confianza.

GT - globulinas totales.

RAG - relación albúmina-globulinas totales.

n - número de individuos.

La cuantificación de proteínas totales, el perfil electroforético (proteinograma) y la relación albúmina-globulinas se emplean en el diagnóstico de las alteraciones proteicas. En particular la relación albúmina-globulinas resulta de especial interés en Clínica, ya que este parámetro permite la clasificación sistemática del perfil electroforético y la identificación de las disproteinemias<sup>20</sup>. En este trabajo los valores de concentración total de proteínas en el plasma atendiendo a la etapa de desarrollo no resultaron significativamente diferentes (categoría juvenil contra categoría sub-adulto) o procedencia (categoría sub-adulto contra medio natural) ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, nuestros resultados arrojaron el mayor valor promedio de concentración total de proteínas en el plasma de los animales cautivos con categoría sub-adulto y el menor, en el plasma de los animales procedentes del medio natural. En correspondencia con este hecho, se encontró el mayor valor de concentración de albúmina en el grupo de animales cautivos con categoría sub-adulto y el menor valor en los animales del medio natural y las diferencias de este parámetro resultaron significativas. Por otra parte, se observó que el valor de relación albúmina-globulinas es mayor para el grupo de animales cautivos con categoría sub-adulto y menor para los animales procedentes del medio natural. El ANOVA reveló que las diferencias entre los valores de relación albúmina-globulinas para los tres grupos son altamente significativas. Los animales cautivos empleados en este estudio fueron alimentados una vez por semana, con una dieta rica en proteínas, mientras que los animales del medio natural se alimentan de una manera más irregular en frecuencia y componentes de la dieta. La relación entre la dieta y la concentración total de proteínas plasmáticas es bien conocida y se fundamenta en el hecho de que la albúmina es la proteína mayoritaria del plasma. Su síntesis ocurre en el hígado a una tasa que depende de la ingestión de proteínas. Una dieta escasa en proteínas provoca una disminución de alrededor del 50% en la síntesis de albúmina en 24 horas<sup>21</sup>. Por lo tanto, su contribución a la concentración total de proteínas y a la relación albúmina-globulinas es significativa.

Algunos autores, empleando electroforesis en acetato de celulosa y valoración densitométrica, han obtenido resultados similares en una población cautiva de *Caiman latirostris* y *Caiman yacare* (categoría sub-adulto): el suministro regular de alimentos promueve los valores de proteína total, albúmina y relación albúmina-globulinas a mayores valores que en animales de Zoológico<sup>22</sup>. Similares resultados han sido encontrados por Uhart y colaboradores<sup>23</sup> para *Caiman yacare*. En un estudio con *Rana catesbeiana*, anfibio de vida acuática filogenéticamente relacionado con los reptiles, se ha determinado que los valores de concentración total de proteínas y de albúmina en el suero son directamente proporcionales a la cantidad y calidad de la proteína dietaria<sup>24</sup> y en caimanes se ha demostrado que el cambio del alimento habitual, rico en carne bovina, a una dieta compuesta por harina de carne y sangre produce un incremento de la albúmina sérica<sup>25</sup>.

Entre otros factores que determinan la alta variabilidad encontrada en los valores experimentales de concentración total de proteínas en el plasma de los reptiles podemos mencionar el método empleado para su determinación. Para este fin no existe un sistema completamente satisfactorio, por lo que elegir el método a emplear dependerá de la cantidad de muestra de la que disponga el investigador, de la necesidad o no de recuperar la muestra intacta, de la presencia de compuestos que pudieran interferir y afectar la especificidad y por último de la sensibilidad, la precisión y la reproducibilidad que se requieran en el estudio. Los métodos de unión a colorantes se utilizan con frecuencia, pero sufren de alta variabilidad entre las proteínas de diferentes especies y esto se debe a la diferente afinidad de las proteínas por los colorantes<sup>26</sup>. Algunos trabajos con reptiles emplean la técnica colorimétrica del Biuret<sup>(27, 28, 29, 30, 31; 32, 33, 34)</sup>. Con esta técnica es posible detectar concentraciones de proteínas de hasta 0.5 mg/mL pero se requieren grandes cantidades de muestra<sup>35</sup>. El método colorimétrico del ácido bicinónico empleado en este estudio, sigue el mismo principio que la reacción del Biuret pero presenta la ventaja de ser un juego de reactivos comercial optimizado lo que garantiza mayor reproducibilidad en los resultados y mayor sensibilidad

del ensayo. Este método permite determinar la concentración total de proteínas en el orden de los  $\mu\text{g/mL}$ <sup>36</sup>. En particular para la determinación de la albúmina en plasma y a pesar de que ha demostrado ser un método poco preciso para especies no mamíferas, el empleo del colorante verde de bromocresol ha sido sugerido por algunos autores (<sup>37,38,39</sup>). Sin embargo, se reconoce que la electroforesis seguida del análisis densitométrico permite medir la albúmina presente en el plasma de una manera más precisa que los métodos basados en el empleo de colorantes. Considerando que algunos autores no describen las técnicas analíticas empleadas en la determinación de los valores de concentración total de proteínas y de albúmina en sus trabajos es muy difícil comparar los datos obtenidos en este trabajo para *Crocodylus rhombifer* con los datos obtenidos para otras especies del Orden.

La electroforesis nativa en gel de agarosa es una de las técnicas electroforéticas más empleada para la separación de las proteínas plasmáticas. Con esta técnica electroforética las proteínas se analizan en su estado nativo. A pH 8.5-9 ellas ganan cargas negativas y migran bajo la acción del campo eléctrico, del electrodo negativo al positivo. El soporte, o sea el gel de agarosa, el cual a diferencia del gel de poliacrilamida tiene poros muy grandes, limita sustancialmente la separación de las proteínas según su tamaño molecular y como resultado las proteínas se separan en función de su densidad de carga superficial. Cuando las proteínas del plasma se resuelven empleando esta técnica, este se fracciona en cinco o seis bandas dependiendo del ajuste del sistema electroforético empleado. Las bandas corresponden a la albúmina, las  $\alpha 1$  globulinas, las  $\alpha 2$  globulinas, las  $\beta 1$  globulinas, las  $\beta 2$  globulinas y las  $\gamma$  globulinas. Por densitometría se puede obtener un trazado que dibuja una serie de ondas o picos en correspondencia con cada una de las bandas. La superficie de cada pico es proporcional a la intensidad de color y tamaño de las bandas originales. El trazado varía de acuerdo a diferentes factores fisiológicos a saber: especie, sexo, edad, estado fisiológico, estado metabólico, aptitud productiva y factores ambientales. La combinación de la electroforesis con la densitometría permite calcular la concentración relativa de las proteínas plasmáticas. Las condiciones selecciona-

das y empleadas en nuestro trabajo nos permitieron fraccionar el plasma de los cocodrilos en 6 fracciones.

Una de las potencialidades de la espectrometría de masas, es su capacidad de dilucidar la secuencia de péptidos. Esto se realiza a través de la descomposición de la molécula ionizada en fragmentos generados durante el proceso de ionización. A partir de las series de fragmentos N-terminal se obtiene la secuencia de aminoácidos desde el extremo C hacia el N, mientras que la series de fragmentos C-terminal brindan la información secuencial del extremo N al C. La diferencia de masas entre señales consecutivas de iones correspondientes a una misma serie, nos indica la pérdida de un aminoácido, la posición que ocupa dentro de la secuencia y en el caso en que se obtengan valores de masas inesperados, estos pueden relacionarse con modificaciones en la estructura de los  $\alpha$ -aminoácidos. De esta forma es posible determinar la secuencia de péptidos de forma bidireccional y localizar modificaciones post-traduccionales. De todas las proteínas plasmáticas, la albúmina es la proteína más pequeña y con mayor número de grupos cargados negativamente; esta característica le permite migrar con mayor rapidez bajo la acción de un campo eléctrico y en geles de agarosa es la fracción más próxima al ánodo. Sin embargo, en esa misma dirección y mucho más próxima al ánodo se observó otra fracción proteica que migró con mayor velocidad que la albúmina. Para establecer la identidad de esa banda se empleó la espectrometría de masas mediante la secuenciación de sus péptidos tripticos. La diferencia de masas de 80 Da entre la señal m/z del ion precursor y la señal del primer fragmento obtenido sugirió la presencia en esa secuencia de un aminoácido fosforilado. A partir de este resultado identificamos a la banda que migró en los geles de agarosa al 2% más próxima al ánodo como albúmina fosforilada. La ausencia en la literatura científica de informes anteriores sobre la separación de una fracción de albúmina fosforilada en el plasma de los cocodrilos puede deberse al hecho de que generalmente para la separación de las proteínas plasmáticas se utilizan sistemas electroforéticos automáticos o semiautomáticos. La mayoría de estos sistemas emplean la electroforesis en acetato de celulosa, la cual resulta menos resolutive que la electroforesis en geles de agarosa, y tiempos de corrida

**Tabla 4.** Valores promedio de la concentración total de proteínas de las fracciones separadas mediante electroforesis en geles de agarosa de *Crocodylus rhombifer* para los grupos de animales cautivos con categoría juvenil (n=20) y cautivos con categoría sub-adulto (n=15)

Procedencia/ Categoría	Cautiverio, categoría juvenil (n=20)				Cautiverio, categoría sub-adulto (n=15)			
	Prom.	DS	IC $\pm$ 95%	Rango	Prom.	DS	IC $\pm$ 95%	Rango
<b>albúmina* (g/dL)</b>	1.86	0.33	1.70-2.01	1.34-2.79	2.07	0.46	1.81-2.32	1.30-3.21
<b><math>\alpha 1</math> globulinas (g/dL)</b>	0.67	0.11	0.62-0.73	0.51-0.97	0.69	0.17	0.60-0.79	0.44-0.98
<b><math>\alpha 2</math> globulinas (g/dL)</b>	0.37	0.08	0.34-0.41	0.23-0.51	0.37	0.08	0.33-0.42	0.23-0.53
<b><math>\beta</math> globulinas (g/dL)</b>	0.95	0.21	0.85-1.05	0.60-1.47	0.86	0.20	0.74-0.97	0.55-1.18
<b><math>\gamma</math> globulinas (g/dL)</b>	1.44	0.31	1.30-1.59	0.97-2.20	1.56	0.49	1.29-1.83	0.84-2.61
<b>GT (g/dL)</b>	3.44	0.53	3.20-3.70	2.70-4.71	3.48	0.73	3.07-3.88	2.23-5.10
<b>RAG</b>	0.54	0.09	0.50-0.59	0.32-0.71	0.60	0.08	0.56-0.64	0.48-0.77

\* Albúmina: se informa como la suma de las fracciones correspondientes a la albúmina nativa y la albúmina fosforilada.

Prom. - valor promedio.

DS - desviación estándar.

IC - intervalo de confianza.

GT - globulinas totales.

RAG - relación albúmina-globulinas totales.

n - número de individuos.

**Tabla 5.** Valores de concentración total de proteínas en el plasma, de albúmina, de globulinas totales y la relación albúmina globulinas para algunas especies del Orden Crocodylia

Familia	Género	Especie	Procedencia	n	PT (g/dL)	albúmina (g/dL)	GT (g/dL)	RAG
Alligatoridae	Caiman	<i>C. latirostris</i>	Cautiverio	-	5.01	2.42	3.31	0.73
				12	5.06	1.66	3.37	0.49
				65	3.80	-	-	-
				109	3.88	0.98	2.92	0.32
				33	4.48	1.43	2.86	0.50
	Alligator	<i>C. yacare</i>	Cautiverio	5	4.28	0.95	3.33	0.29
				114	4.10	0.95	3.13	0.30
				-	6.20	1.80	4.40	0.41
				-	5.10	-	-	-
				-	5.30	1.90	3.10	0.61
Crocodylidae	<i>Crocodylus</i>	<i>C. niloticus</i>	-	-	5.0	-	-	-
				6	8.82	-	-	-
				-	6.50	-	-	-
				10	4.54	-	-	-
				10	3.69	-	-	-
		<i>C. acutus</i>	Vida libre	10	4.28	-	-	-
				7	4.70	-	-	-
				-	4.1-7.0	1.40-2.30	2.70-5.00	-
				35	5.41	1.95	3.40	0.57
				8	4.89	1.50	3.39	0.44

PT – concentración total de proteínas en el plasma, GT – concentración total de globulinas en el plasma, RAG – relación albúmina-globulinas totales, n – número de individuos.

que no sobrepasan los 30 minutos<sup>(40;41,42)</sup>. La fosforilación de las proteínas es una modificación post-traducciona muy importante porque regula la división y la diferenciación celular así como la función de las proteínas. La fosforilación y la desfosforilación catalizada por proteínas quinasas y fosfatasa puede modificar la función de las proteínas de casi todas las maneras posibles: aumentando o disminuyendo su actividad biológica, estabilizándola o marcándola para su destrucción, facilitando o impidiendo su movimiento entre compartimentos celulares, iniciando o disociando las interacciones proteína-proteína. La fosforilación de la albúmina encontrada en este estudio pudiera responder a uno de los mecanismos de regulación planteados para mediar los ritmos de síntesis y degradación de esta proteína en los cocodrilos<sup>43</sup>.

## Conclusiones

El valor promedio de concentración total de proteínas en el plasma de una muestra de la población de *Crocodylus rhombifer* en cautiverio fue de  $5.41 \pm 0.92$  g/dL. El rango de valores osciló entre los 3.53 - 7.53 g/dL. Estos valores están en el rango informado para la clase Reptilia. Mediante el empleo de la espectrometría

de masas fue posible identificar la fosforilación de la albúmina del plasma de *Crocodylus rhombifer*. A partir de este hallazgo sugerimos que la fracción que migró más próxima al ánodo en los geles de agarosa al 2% corresponde a la albúmina fosforilada. La electroforesis en gel de agarosa al 2% permitió separar el plasma en seis fracciones proteicas correspondientes a la albúmina fosforilada, la albúmina nativa, las  $\alpha 1$  globulinas, las  $\alpha 2$  globulinas, las  $\beta$  globulinas y las  $\gamma$  globulinas. Los valores promedio de la concentración de proteínas de las diferentes fracciones del plasma de una muestra de la población de animales cautivos de *Crocodylus rhombifer* fueron: albúmina  $1.95 \pm 0.40$  g/dL,  $\alpha 1$  globulinas  $0.61 \pm 0.14$  g/dL,  $\alpha 2$  globulinas  $0.37 \pm 0.08$  g/dL,  $\beta$  globulinas  $0.91 \pm 0.21$  g/dL y  $\gamma$  globulinas  $1.49 \pm 0.39$  g/dL. No se observaron diferencias significativas entre los valores de la concentración total de proteínas en el plasma y de las fracciones separadas mediante electroforesis en geles de agarosa entre los animales cautivos de acuerdo a la etapa del desarrollo.

## Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias al soporte financiero recibido de la Fundación Alexander von Humboldt de Alemania.

## Referencias bibliográficas

1. Cuvier, G.L.C.F.D.B.d. (1807) Sur les diferentes especes de crocodiles vivantes et sur leurs caracteres distinctifs. Ann Mus Hist Nat. 10: 8-66.
2. Ramos, R. (2006) First National Workshop on the Status of the Cuban Crocodile. Group Specialist Crocodile Newsletter. 25 (4): 5-6.
3. Ramos R. (2013) Ecología y conservación del cocodrilo cubano (*Crocodylus rhombifer*) en la "Ciénaga de Zapata", Cuba. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante, España y Universidad de Pinar del Rio, Cuba.
4. Targarona, R. R.; R. R. Soberón; L. Cotayo; M. A. Tabet, y J. Thorbjarnarson (2008) *Crocodylus rhombifer*. En: IUCN Red List of Threatened Species.
5. Barragán, F. y B. Karol (2002) Enfermedades de Reptiles y Anfibios. Boletín GEAS. Vol III, No 2: 18-27.
6. Strik, N.I., A.R. Alleman y K.E. Harr (2007) Circulating Inflammatory Cells. Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: Color Atlas and Text. CRC Press. Florida, Estados Unidos, 167-218.
7. Zaldívar, C. y G. Hernández (1987) Temas de Bioquímica Clínica. Combinado Poligráfico Evelio Rodríguez Curbelo. Cuba. 7-23.
8. Zaias, J. y Cray, C. (2002) Protein electrophoresis: a tool for the reptilian and amphibian practitioner. JHMS, 12: 30-32.
9. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685. DOI:10.1038/227680a0.
10. Tao Huang, Xueling Chen, Huan Gu, Conghui Zhao, Xingmu Liu, Meiling Yan, Xiaodong Deng, Zaiping Zhang y Jiang Gu. (2016) Fractionation of Fab glycosylated immunoglobulin G with concanavalin A chromatography unveils new structural properties of the molecule. Oncotarget 7: 31166 – 31176. DOI: 10.18632/oncotarget.9085.
11. MASCOT, <http://www.matrixscience.com>
12. UniProtKB, <http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>
13. Calvacante, P.H., A.C. Silva, S.M. Sakamoto y B. Soto (2012) Serum protein fractions in Brazilian-breed donkeys using agarose gel electrophoresis. Turk Vet Anim Sci. 36: 9-12. DOI:10.3906/vet-1011-565
14. Campbell, T.W. (1996) Clinical Pathology. Reptile Medicine and Surgery. W.B. Saunders Company. Filadelfia, Estados Unidos de América. 248-247.
15. Stacy, B.A y N. Whitaker (2000) Hematology and blood biochemistry of captive mugger crocodile (*Crocodylus palustris*). Zoo and Wildlife Med. 31: 339-347.
16. Campbell, T.W. (2004) Blood Biochemistry of Lower Vertebrates. American College of Veterinary Pathologists & American Society for Veterinary Clinical Pathology. Disponible en: [www.acvp.org](http://www.acvp.org).
17. Gicking J.C., B.S. Allen, M. Foley, E.H. Kendal, R.E. Raskin y E. Jacobson (2004) Plasma Protein Electrophoresis of the Atlantic Loggerhead Sea Turtle, *Caretta caretta*. Herpetological Medicine and Surgery 14: 13-17.
18. Coppo, J.A, N.B. Mussart, S.A. Fioranelli y P.A. Zeinsteger (2005) Blood and urine physiological values in captive Bullfrog, *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae). Rev vet. 25: 15-17.
19. Koza, G.A.; N.B. Mussart; N.N. Barboza y J.A. Coppo (2011) Morphometrical and hematological changes in *Caiman yacare* supplemented with beef and fish meats. Rev vet. 22: 114-118.
20. Kaneko, J. (1997) Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Serum Proteins and the Dysproteinemias. 117 – 138 pp. Elsevier. DOI:10.1016/B978-012396305-5/50000-2.
21. Allison, A.C. (1976) Structure and function of plasma protein. Plenum press, New York, Estados Unidos de América, 72-208 pp.
22. Coppo J.A., N.B. Mussart, N.N. Barboza, P.A. Zeinsteger y W.S. Prado (2006) Electrophoretic proteinogram reference interval from Argentina Northeastern captive caimans (Crocodylia: Alligatoridae). In Vet. 8 (1): 129-137.
23. Uhart M, W. Prado, P. Beldoménico, C. Rossetti, M.C. Ferreyra, A. Martínez, J.C. Bardón, G. Avilés y W. Karesh (2001) Estudios sanitarios comparativos de yacarés (*Caiman latirostris* y *Caiman yacare*) silvestres y cautivos. Boletín Técnico Fundación Vida Silvestre Argentina. 55: 1-15.
24. Coppo, J.A., N.B. Mussart y S.A. Fioranelli (2004) Impacto de la alimentación, clima y sistema de manejo del criadero sobre el peso y las proteínas plasmáticas de *Rana catesbeiana*. Vet Arg. 21: 101-116.
25. Ferreyra, H. y M. Uhart (2001) Evaluación y evolución del estado sanitario de *Caiman latirostris* y *Caiman yacare* en el Refugio El Cachapé. Boletín Técnico de la Fundación Vida Silvestre Argentina No 55, anexo III: 1- 15.
26. Harr, K.E. (2002) Clinical chemistry of comparison avian species: a review. Vet Clin Path. 31: 140-151. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2002.tb00295.x.
27. Dessauer H.C. (1970) Blood Chemistry of Reptiles: Physiological and Evolutionary aspects. Academic Press. New York, Estados Unidos de América, 1-72.
28. Lance, V., T. Joanen, y L. McNease (1983) Selenium, vitamin E, and trace elements in the plasma of wild and farm-reared alligators during the reproductive cycle. Can J Zool. 61: 1774-1751.
29. Densmore, L. D. y R. D. Owen (1989) Molecular systematic of the order Crocodylia. Amer Zool. 29: 831-841.
30. Sigler, L. (1990) Constantes Fisiológicas y Valores Hemáticos de Cocodrilianos Mexicanos en Cautiverio en los estados de Chiapas, Quintana Roo y Yucatán. Tesis Doctoral. División de Estudios Profesionales de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México.
31. Ponce-Campos, P., C. Magallón-Morineau, J. Quintana y J. Dubach (2004) Concentraciones Totales de Proteína en Plasma del "Caimán" *Crocodylus acutus* en Poblaciones Silvestres de Jalisco, México. Memorias de la VI Reunión de Trabajo de la COMACROM, Puerto Vallarta, Jalisco, 25-27 de agosto, 9 pp.
32. Gicking J.C., B.S. Allen, M. Foley, E.H. Kendal, R.E. Raskin y E. Jacobson (2004) Plasma Protein Electrophoresis of the Atlantic Loggerhead Sea Turtle, *Caretta caretta*. Herpetological Medicine and Surgery. 14: 13-17.
33. Barboza N., N.B. Mussart, J.A. Coppo, S.A. Fioranelli y G.A. Koza (2008) El medio interno de *Caiman latirostris* en cautiverio. Influencia del sexo, crecimiento y estación del año. Rev vet. 19: 33-41.
34. Barboza, N, A. Panseri, N.B. Mussart, G.A. Kosa y J.A. Coppo (2010) Análisis multivariado de los cambios hemáticos y morfométricos de *Caiman latirostris* y *Caiman yacare* según especie, sexo y estación del año. Rev vet 21: 112-122.
35. Sapan C., L. Roger, N. Lundblad y C. Price. (1999) Colorimetric protein assay techniques. Biotechnol Appl Biochem. 29: 99-108. DOI: 10.1111/j.1470-8744.1999.tb00538.x.
36. Boletín técnico Micro BCA Protein Assay Kit, [www.piercenet.com](http://www.piercenet.com).
37. Spano, J.S., J.F. Whitesides, W.M. Pedersoli, L.M. Krista y W.M. Ravis (1988) Comparative albumin determinations in ducks, chickens and turkeys by electrophoretic and dye-binding methods. Am Vet Res. 49: 325-326.
38. Cray, C. y L.M. Tatum (1998) Applications of protein electrophoresis in avian diagnostics. Avian Med Surg. 12: 4-10.
39. Harr, K.E. (2002) Clinical chemistry of comparison avian species: a review. Vet Clin Path. 31: 140-151. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2002.tb00295.x.
40. Alberghina, D., S. Casella, I. Vazzana, V. Ferrantelli, C. Giannetto y G. Piccione (2010) Analysis of serum proteins in clinically healthy goats (*Capra hircus*) using agarose gel electrophoresis. Vet Clin Pathol 39: 317-321. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2010.00226.x.
41. Giménez, M., J. Martorell, Y. Saco, R. Pato y A. Bassols (2009) Proteinograma en *Iguana iguana*: valores de referencia, detección de bisalbuminemia y localización de hemolisis, fibrinógeno y lipemia. 42 Congreso Nacional de AVEPA: 292 pp.
42. Cooper-Bailey, K., S.A. Smith, Z. Kurt, R. Lane, R.E. Raskin y D. de Nardo (2011) Hematology, leukocyte cytochemical analysis, plasma biochemistry, and plasma electrophoresis of wild-caught and captive-bred Gila monsters (*Heloderma suspectum*). Vet Clin Pathol. 40: 316-323. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2011.00337.x.
43. Pinwattana, K., J. Wangb, C-T. Linb, H. Wub, D. Dub, Y. Linb y O. Chailapakul (2010) CdSe/ZnS quantum dots based electrochemical immunoassay for the detection of phosphorylated bovine serum albumin. Biosensors and Bioelectronics 26: 1109-1113. DOI:10.1016/j.bios.2010.08.02.x.



## INVESTIGACIÓN

## Área de vida, dieta, preferencia de estrato vertical y uso del tiempo de *Bradypus variegatus*, liberados en la Estación Científica Agroecológica Fátima

Living area, diet, preferably vertical stratum and time use of *Bradypus variegatus*, released in Fatima Agroecology Research Station

Gabriel Carrillo-Bilbao<sup>1,4</sup>, Víctor Curicama<sup>1,4</sup>, Roberto Ruíz<sup>1</sup>, Sarah Martin-Solano<sup>1,2,3,4</sup>

## RESUMEN

Las principales amenazas de *Bradypus variegatus* son: la caza, el tráfico ilegal y la fragmentación de su hábitat. Este estudio determina aspectos básicos como: área de vida, preferencia de estrato vertical, uso del tiempo y dieta. En la Estación Científica Agroecológica Fátima (ECAAF), ubicada en la Provincia de Pastaza, dos hembras fueron liberadas y monitoreadas por un sistema de telemetría en un período de siete meses, en donde se tomaron datos comportamentales, especies vegetales que consumen y datos de rango de desplazamiento diario. Las hembras liberadas mantienen áreas de vida de 8,5 ha (hembra H-001) y 3,7 ha (hembra H-002), con una media de 6,1 ha de acuerdo al método del Mínimo Polígono Convexo. De acuerdo al método de Kernel el área de vida es de 13,2 ha y 5,8 ha respectivamente con una media de 9,5 ha. El estrato vertical arbóreo preferido por ambas hembras, es dosel del bosque (H-001 = 56,7 % y H-002 = 53,5 %). Identificamos 14 especies vegetales como parte de su dieta, siendo las hojas las únicas utilizadas. El comportamiento con mayor porcentaje registrado fue reposo (H-001 = 94,7 % y H-002 = 92,42 %). Estos datos son los primeros registrados para Ecuador.

**Palabras clave:** área de vida, *Bradypus variegatus*, dieta, preferencia de estrato vertical, uso del tiempo.

## ABSTRACT

The main threats for *Bradypus variegatus* are: hunt, illegal traffic and habitat fragmentation. The goal of this study was to determine basic ecology aspects such as: the home range, preference of vertical strata, time budget and diet. At the Agroecological Scientific Station Fatima (ECAAF), located in the province of Pastaza, Ecuador, two females were released and monitored by telemetry system over a period of time of seven months. The following data was taken: Behavior, plant species of their diet and range of daily displacement. Released females maintain a home range of 8.5 ha (female H-001) and 3.7 ha (female H-002) with an average of 6.1 ha according to the method of Minimum Convex Polygon. According to the method of Kernel, home range is 13.2 ha and 5.8 ha with an average of 9.5 ha. Arboreal vertical strata preferred by two individuals, is the canopy (H-001 = 56.7% and H-002 = 53.5%). We identified a total of 14 plant species as part of their diet, and the leaves were the only resource observed to be eaten. The behavior with the highest percentage registered was rest (H-001 = 94.7% and H-002 = 92.42%). This is the first report of this kind of data for Ecuador.

**Keywords:** home range, *Bradypus variegatus*, diet, vertical strata preference, time budget.

## Introducción

En Ecuador, la degradación de hábitat, la sobre explotación de recursos, la introducción de especies que se convierten en invasoras y el tráfico de especies silvestres se han identificado como las principales razones de la pérdida de la biodiversidad (1, 2). El tráfico de especies es considerado a nivel mundial como una de las actividades más rentables después del tráfico de drogas y armas (3). Adicionalmente, la autoridad ambiental nacional no posee información actualizada sobre el estado de conservación de las poblaciones silvestres,

por lo que todo tipo de esfuerzo en este sentido es considerado fundamental para la conservación de las mismas (3-5). En nuestro país no existen estudios detallados sobre estas problemáticas, lo que impide que se desarrollen estrategias efectivas para su conservación (1, 2, 4-7). A nivel nacional son muy escasos o casi inexistentes los estudios sobre las especies silvestres y sobre el volumen de las mismas destinadas al tráfico y tenencia ilegal. Lamentablemente estas actividades tienen una incidencia sobre la biodiversidad y los ecosistemas más aun basados en que el tráfico a nivel nacional no discrimina a ninguna especie. (3, 5)

<sup>1</sup> Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador.

<sup>2</sup> Departamento Ciencias de la Vida y de la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Av. General Rumiñahui s/n, Sangolquí, Ecuador.

<sup>3</sup> Behavioural Biology Unit, Department of Biology, Ecology and Evolution, Faculty of Science, University of Liège. Belgium.

<sup>4</sup> Estación Científica Agroecológica Fátima. Puyo, Ecuador.

En la provincia de Pastaza se han evidenciado una serie de actividades por parte de la autoridad ambiental, como por ejemplo la implementación y rehabilitación de puntos de control, y a su vez controles móviles, que buscan evitar el tráfico de especies silvestres y el consumo de la carne de las mismas (8). Para este órgano gubernamental una de sus prioridades es la liberación de todos los animales rescatados (9).

La especie *Bradypus variegatus* se encuentra amenazada por la caza, el tráfico ilegal para mascotas, la degradación y fragmentación de los bosques, afectando su desplazamiento debido a su locomoción arbórea (4). Al igual que otras especies producto del tráfico, las condiciones de su manutención son precarias. Colombia estima que el 90 % de los individuos de esta especie capturados mueren en manos de los traficantes o compradores y el 10 % termina en unidades de manejo de fauna silvestre (4). La taxonomía de todas las especies de perezosos reconocidas requieren investigaciones así como los datos sobre los tamaños poblacionales, rangos, dinámicas e historia de vida, los cuales continúan siendo insuficientes, muestra de esto es que los planes de manejo de las especies de perezosos son inexistentes (4, 10).

Se registran seis especies de perezosos agrupados en dos familias: Megalonychidae, con dos especies *Choloepus didactylus* y *C. hoffmanni* y la familia Bradypodidae, con: *Bradypus torquatus*, *B. variegatus*, *B. tridactylus* y *B. pygmaeus*. Las seis especies se caracterizan por tener un comportamiento solitario relativamente lento en comparación con mamíferos de características similares (11-13).

*Bradypus variegatus*, su nombre común es perezoso tridáctilo, perezoso bayo, perezoso grisáceo o guasa (10), y es considerado un mamífero folívoro y arbóreo (14). Se encuentra considerado de acuerdo a la lista de la UICN como una especie de poca preocupación (10). A la fecha se reconocen seis subespecies (15), y mantienen un rango de distribución amplio que va desde Honduras, el sur de América Central, hasta Sudamérica en la región oeste de la Amazonía y en los bosques atlánticos, los cuales constituyen unidades eco evolutivas únicas por lo que las subespecies se distinguen solo desde un punto de vista molecular (16-20). En Sudamérica, los países en los que se registra son: Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil y se piensa que en Argentina estaría extinto siendo su último registro en 1916. Su gradiente altitudinal de distribución va desde el nivel del mar hasta los 2400 m. (10, 17, 21, 22).

En Ecuador, datos sobre el estado de su población son inexistentes, pero se reconoce que tanto el año 2008 y el 2013 ha sido la especie más traficada en relación al orden Pilosa (3, 5). Tanto en Brasil como en Colombia sus poblaciones están declinando debido a una elevada deforestación y por ende algunas subespecies mantienen una baja diversidad genética (10, 20). A parte de las amenazas ya mencionadas, se menciona la caza por comunidades locales como fuente de alimento y es usado como medicina, lo que produce una incidencia directa en los impactos de las poblaciones silvestres (10, 23).

De igual forma, en Ecuador no existen datos ecológicos pero se conoce que prefieren varios tipos de bosques como bosques nublados, semi deciduos y tropicales (24). En Costa Rica, se han reportado individuos en plantaciones de cacao (24). Esta especie podría generar un infante en intervalos de 19 meses y el período de copulas se daría para Sudamérica de Julio a Noviembre (10, 25). A la fecha, sus densidades poblacionales registradas pueden ir de 0,6 animales por hectárea registrado para Colombia (26) a 8,5 animales por hectárea en Panamá (11). Los perezosos comprenden entre el 25 % y el 67 % del total de la biomasa vertebrada en algunos bosques neotropicales, lo que ratifica la importancia de estas especies en la dinámica de los bosques (26, 27). Por ejemplo en Barro Colorado, estas especies ocupan el 40 %, de la biomasa del bosque (23).

La presente investigación busco determinar aspectos ecológicos y comportamentales básicos como son: el área de vida,

especies vegetales que forman parte de la dieta, preferencia de estrato vertical y uso del tiempo de *Bradypus variegatus* (Schinz, 1825), datos que son inexistentes a nivel nacional y poco relevantes a nivel internacional.

## Métodos

### Área de estudio

Este estudio se llevo a cabo en La Estación Científica Agroecológica Fátima, (1°26'51,910"S, 78°0'38,220"W), la cual se encuentra ubicada en la región amazónica central en la Provincia de Pastaza, Cantón Pastaza, Parroquia Fátima, con un gradiente altitudinal que va desde los 900 hasta los 1100 msnm (Fig. 1) (28).



Fig. 1. Ubicación Estación Científica Agroecológica Fátima.

### Metodología

Los dos individuos liberados fueron dos hembras (H-001 y H-002), catalogadas como liberables por parte de los técnicos de la Dirección Provincial de Medio Ambiente de Pastaza. Previa a la liberación, se les colocó un collar de telemetría (RI-2DM, Holohil Systems, Ontario, Canada), por individuo, siguiendo el protocolo de procedimiento utilizados para monos nocturnos (29-31) una especie de hábitos arbóreos y de similares características. Los individuos con radio collares, fueron localizados con antenas RA-2AK y receptores TR-4 (Telonics, Mesa, Arizona, Estados Unidos).

La toma de datos se llevo a cabo por un período de siete meses, Agosto del 2014 a Marzo del 2015. Previa al seguimiento, se elaboró un sistema de transectos, mapeados y marcados, para facilitar el seguimiento de los individuos (30-32). El seguimiento consistió en tomar datos de uso de estrato vertical, desplazamiento, dieta y comportamiento (30, 31), desde las 6:00 hr a las 18:00 hr, durante períodos de tres días seguidos por individuo.

Los datos se los consignó en formatos previamente diseñados. Para el uso de estrato vertical se decidió utilizar las siguien-

tes categorías: dosel, subdosel, sotobosque, y suelo registrado cada diez minutos. Los datos de rango de desplazamiento se los tomó cada 20 minutos en donde se registró la ubicación del individuo (30, 31). Para el registro comportamental se lo llevó a cabo cada cinco minutos durante 20 minutos para completar una muestra focal, siendo las categorías comportamentales a utilizarse: movimiento, forrajeo, descanso, acicalamiento y otros (13, 30, 31, 33).

Para el cálculo del área de vida se emplearon los métodos del Mínimo Polígono Convexo y Kernel al 95 %, con el programa ArcView 3.2 y sus extensiones "animal movement" y "home range" (Environmental Systems Research Institute, Redlands, California, Estados Unidos). Para la dieta se colectó e identificó taxonómicamente las especies consumidas por los individuos durante los periodos de seguimiento (7, 24, 30, 31, 34).

Los análisis estadísticos se los realizó en base a correlaciones de Spearman y análisis de componentes principales entre las distintas variables (tiempo, preferencia de estrato vertical, rango de desplazamiento, comportamiento y dieta). Además se determinó los porcentajes de los muestreos instantáneos y de barrido en los que se registró cada una de las variables dependientes cuantificadas (por ejemplo, forrajeo, estrato arbóreo) en cada hora, obteniendo luego promedios para cada día y para toda la duración del estudio. Para comparar entre las dos hembras el uso del estrato vertical y el uso del tiempo se utilizó la prueba no paramétrica de Mann Whitney U test.

## Resultados

### Área de vida

Basado en el método del Mínimo Polígono Convexo, H-001, utilizó 8,5 ha de área de vida, mientras que la H-002: 3,7 ha, lo que nos permite obtener una media de 6,1 ha, con 0,13 ha de solapamiento entre las áreas de vida de los individuos (Fig. 2). Según el método de Kernel al 95 %, para H-001 y H-002, es de 13,2 ha y 5,8 ha, respectivamente y una media de 9,5 ha, con un solapamiento de 1,6 ha (Fig. 3).

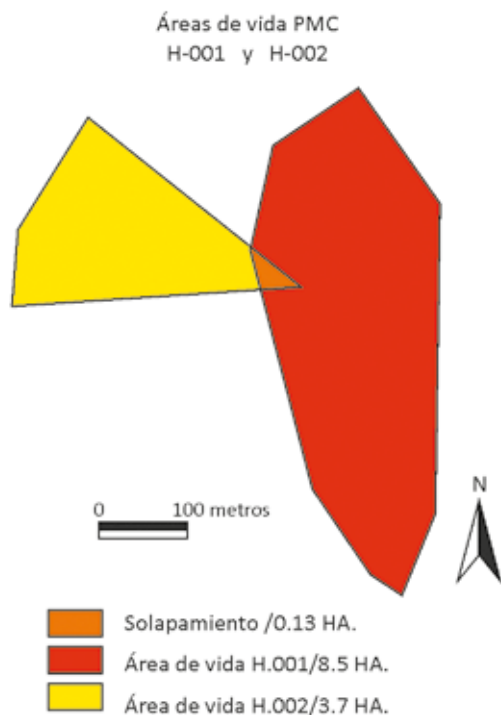


Fig. 2. Área de vida, Polígono Mínimo Convexo. H-001-H-002.

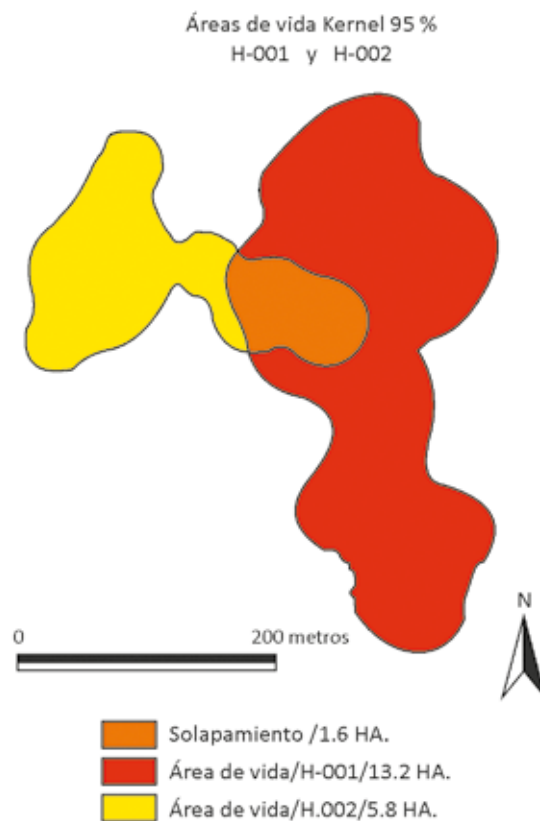


Fig. 3. Área de vida, Método de Kernel. H-001 y H-002.

### Uso de estrato vertical

Se encontraron diferencias significativas en el uso del estrato vertical entre las dos hembras (Mann-Whitney U test  $U = 10695212.5$ ,  $p=0.003$ ). Las dos hembras mantuvieron sus mayores porcentajes registrados a los estratos altos del bosque, dosel y subdosel (H-001, 56,7 % dosel y 43,3 % subdosel ; H-002, 53,5 % dosel y 46,5 % subdosel). La media por estrato fue de 55,1 % para el dosel y el 44,9 % para el subdosel.

### Dieta

H-001 y H-002, utilizaron un total de 14 especies vegetales, agrupadas en 10 géneros perteneciente a 10 familias, siendo la familia Urticaceae la más utilizada con un total de 3 especies (Tabla 1). De acuerdo a las observaciones, el único recurso vegetal utilizado fueron las hojas.

### Uso del tiempo

En relación al uso el tiempo, se encontraron diferencias significativas entre ambas perezosas (Mann-Whitney U test  $U = 10607629.0$ ,  $p=0.000$ ). H-001 registró el 94,7 % del tiempo en reposo, 2,3 % en movimiento y 2,9 % del tiempo forrajeando, mientras que H-002, el 92,4 % del tiempo se observó en reposo, 4,9 % en movimiento y 2,6% del tiempo forrajeando. Además se identificó una correlación positiva para ambas perezosas entre el comportamiento y la hora (H-001:  $rx = 0,059$ ,  $p = 0,01$ ,  $n = 5075$  y H-002:  $rx = 0,064$ ,  $p = 0,01$ ,  $n = 4088$ ). Sin embargo no se observó una correlación entre el estrato y el comportamiento (H-001:  $rx = 0,004$   $p = 0,779$ ,  $n = 5075$  y H-002:  $rx = 0,022$   $p = 0,162$ ,  $n = 4088$ ) y el estrato y la hora (H-001:  $rx = 0,009$ ,  $p = 0,535$ ,  $n = 5075$  y  $rx = -0,001$ ,  $p = 0,957$ ,  $n = 4088$ ).

El Análisis de Componentes Principales de los datos de H-001, identificó tres componentes principales dentro del modelo, donde los dos primeros permiten explicar el 68,6 % de la variabilidad de los datos, así como logramos evidenciar en el primer componente una fuerte asociación entre la variable comportamiento y la variable hora.

**Tabla 1.** Especies vegetales identificadas que forman parte de la dieta de *Bradypus variegatus*

Familia	Género	Especie	N. Común
Acanthaceae	<i>Sanchezia</i>	<i>skutchii</i>	Dedos de fuego
Melastomataceae	<i>Miconia</i>	<i>prasina</i>	Camasey blanco
Melastomataceae	<i>Miconia</i>	<i>venulosa</i>	Miconia
Fabaceae	<i>Inga</i>	<i>cayennensis</i>	Guaba
Chlorantaceae	<i>Hedyosmum</i>	<i>sprucei</i>	Sacha limón ponga
Malvaceae	<i>Herrania</i>	<i>nycterodendron</i>	Cacao silvestre
Urticaceae	<i>Cecropia</i>	<i>sciadophylla</i>	Yarumo Blanco
Urticaceae	<i>Cecropia</i>	<i>ficifolia</i>	Yarumo
Urticaceae	<i>Cecropia</i>	<i>menbranacea</i>	Guarumo
Moraceae	<i>Ficus</i>	<i>trigona</i>	Chilamate
Moraceae	<i>Ficus</i>	<i>andicola</i>	Higuerón
Clusiaceae	<i>Chrysochlamys</i>	<i>bracteolata</i>	Tolapa
Asteraceae	<i>Piptocoma</i>	<i>discolor</i>	Llenger
Poaceae	<i>Guadua</i>	<i>angustifolia</i>	Aladierno

En el Análisis de Componentes Principales de H-002, logramos identificar tres componentes principales, dentro del modelo donde los dos primeros componentes permiten explicar el 68,8 % de la variabilidad de los datos, y se identifica claramente en el primer componente que se asocia fuertemente la variable comportamiento y la variable hora.

## Discusión

Este estudio, es el primero a nivel nacional donde se logra identificar aspectos ecológicos básicos para dos hembras liberadas de *Bradypus variegatus* como: área de vida, especies vegetales que forman parte de la dieta, uso de estrato vertical del bosque y uso de tiempo.

## Área de vida

El área de vida de H-001 y H-002 son similares para hembras de esta especie en Costa Rica, cuya media es de 6,4 ha, calculada mediante el método del Mínimo Polígono Convexo (24), mientras que en Panamá se han identificado áreas de vida menores a 2 hectáreas (35). Para otras especies hembras de perezosos como *Bradypus torquatus*, han identificado medias de 11,4 ha en Brasil mediante el método del MPC y 6,9 ha mediante Kernel al 95 % (36). Sin embargo encontraron un rango de variedad de áreas de vida, lo que coincide con nuestro estudio ya que hay una marcada diferencia entre las dos perezosas. Esto puede deberse a varios factores como edad o condición reproductiva. Sin embargo como nuestro estudio fue la reintroducción de una especie entregada por el ministerio del ambiente, la edad es incierta. Y en cuanto a la condición reproductiva, es necesario tomar en cuenta esta variable para hacer estudios posteriores con control hormonal e identificar su estado reproductivo, ya que dos meses luego de finalizar el estudio se comprobó el nacimiento de una cría en la hembra H-002.

## Dieta

El número de especies vegetales utilizadas como dieta, por parte de H-001 y H-002, de las cuales utilizaron como recurso alimenticio sus hojas, es similar al registrado en Costa Rica donde se han identificado un total de 15 especies. Sin embargo en Costa Rica, además de las hojas, utilizaron también las inflorescencias (24). Para Colombia, en el estudio de Ballesteros C, Reyes C (37), se mencionan menos especies vegetales consumidas con un total de nueve especies y cuatro especies vegetales para el estudio de Castro-Vásquez, Meza (38). En algunos estudios de *Bradypus variegatus* identifican al género *Cecropia* dentro de su alimentación. En Costa Rica, identifican 4 especies pertenecientes a su dieta,

*Cecropia obtusifolia*, *Coussapoa villosa*, *Nectandra salicifolia*, y *Pterocarpus officinalis*, de las cuales comparten el género *Cecropia* (39). De igual forma para Venezuela (13), identifican 11 especies, de las cuales *Cecropia* es nuevamente representado como un género de alimento para esta especie de perezoso. En la especie de *Bradypus torquatus*, identifican 21 especies, de las cuales mencionan también la presencia de dos especies del género *Cecropia* dentro de su dieta (40).

## Uso de estrato vertical

Las medias relacionadas con la preferencia del estrato vertical del bosque es del 55,1 % para el dosel y el 44,9 % para subdosel, lo cual coincide con los estratos verticales del bosque utilizados registrados para la especie en Colombia y Brasil (33, 41, 42).

## Uso del tiempo

A nivel local y regional es muy escasa la información relacionada con el uso del tiempo por parte de esta especie. Un estudio realizado en Colombia registran medias para los comportamientos de Reposo y Forrajeo similares a nuestro estudio (83,4 % y 2,10 % respectivamente) (38). Otro estudio en Venezuela (13), realizado a una altura similar al presente estudio, registra un porcentaje inferior a la categoría de reposo (72,9 %). El presente estudio es uno de los pocos en analizar este tipo de datos para *Bradypus variegatus* datos.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos de los dos individuos liberados en cuanto a áreas de vida, así como de preferencia de estrato vertical del bosque, se encuentran reportados para la especie a nivel regional. De igual forma, la dieta corresponde a un número similar de especies vegetales al estudio realizado en Costa Rica, sin embargo, es mayor a la reportada en Colombia.

- Luego de aplicación de los modelos estadísticos para correlaciones y el análisis de componentes principal podemos sugerir que tanto el comportamiento y la hora del día donde registran actividad se encuentran correlacionada y dentro del primer componente se identifica a la hora y el comportamiento como componentes fuertemente asociados.
- Estos datos a la fecha son únicos a nivel nacional, los cuales se convierten en una herramienta directa enfocada a la conservación de esta especie. Estos datos son relevantes y esenciales para proponer estrategias locales eficaces de conservación sobre esta especie, aunque es considerada generalista, con una amplia distribución (35, 43) y catalogada como de preocupación menor (44).



## Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Central del Ecuador, a la Universidad de las Fuerzas Armadas, Al Ministerio del Ambiente del Ecuador- Dirección Distrital Pastaza, a EICSA por el financiamiento.

## Referencias bibliográficas

- Carrillo G, Martín S, Huynen M. Primates ecuatorianos en peligro por las actividades antropogénicas. In: Liège LÉdlUd, editor. Amazonía: Civilisations et Barbaries. Belgium; 2009.
- Biodiversidad DNd. Situación Actual del tráfico ilegal de la vida silvestre. Quito: Ministerio del Ambiente; 2008.
- MAE. Informe del tráfico ilegal de especies en el Ecuador Continental en el año 2013: Ministerio del Ambiente del Ecuador; 2013 Contract No.: Document Number].
- Moreno S, Plese T, Rodríguez C. Estrategia Nacional para la prevención y control al tráfico ilegal de las Especies Silvestres de Perezosos en Colombia. Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia; 2009.
- MAE. Situación Actual del tráfico ilegal de la vida silvestre. Quito: Ministerio del Ambiente del Ecuador; 2008 Contract No.: Document Number].
- Carrillo-Bilbao GA, Martín-Solano S, Bravo J, Huynen M-C, editors. Ecuador and Belgium working for the conservation of primates. BELGIUM: Lieja University; 2008.
- Bovy E, Martín-Solano S, Carrillo-Bilbao GA. Estudio preliminar sobre la caza de mamíferos en el Bosque Protector Oglan Alto, Ecuador. En revisión. 2009.
- MAE. Ministerio del ambiente rescata 79 especies en Pastaza y cumple con su deber de proteger la fauna ecuatoriana. Pastaza.: Ministerio del Ambiente del Ecuador; 2012 Contract No.: Document Number].
- MAE. MAE Pastaza Libera un Oso Perezoso. Pastaza: Ministerio del Ambiente Ecuador; 2014 Contract No.: Document Number].
- Superina M, Plese T, Moraes-Barros N, Abba AM. The 2010 Sloth Red List Assessment. Edentata. 2010 2010/12/01:115-34.
- Queiroz HL. Preguiças e Guaribas: os Mamíferos Folívoros Arborícolas do Mamirauá. Mamirauá CeSC, editor. Brasília; 1995.
- Chiarello AG. Sloth ecology: an overview of field studies. In: Vizcaino S, Loughry L, editors. The Biology of the Xenarthra. Gainesville: University of Florida Press; 2008. p. 269-80.
- Urbani B, Bosque C. Feeding ecology and postural behaviour of the three-toed sloth (*Bradypus variegatus flaccidus*) in northern Venezuela. Mammalian Biology 2006(72):321-9.
- Laufer J, Amador JA, Conceição PC, Norris D, Michalski F. Use of Boat Surveys to Provide Complementary Data on the Ecology of *Bradypus Tridactylus* (Pilosa: Bradypodidae) from Northern Amazonia. Edentata. 2012 2012/12/01;13(1):56-60.
- Gardner A. Volume 1. Marsupials, Xenarthrans, Sherws, and Bats. Gardner A, editor. Chicago: The University of Chicago Press, Chicago 60637; 2007.
- Moraes-Barros N, Miyaki C, Morgante J. Identifying management units in non-endangered species: the example of the sloth *Bradypus variegatus* Schinz, 1825. Braz J Biol. 2007(67):829-937.
- Emmons LH, editor. Neotropical Rainforest Mammals: A Field Guide. 2nd ed. IL: The University of Chicago Press, Chicago, 396 pp; 1997.
- Moraes-Barros N, Miyaki C, Mortange J. Genetic diversity in different populations of sloths assessed by DNA fingerprinting. Braz J Biol. 2002(62).
- Moraes-Barros N, Giorgi A, Silva S, Morgante J. Reevaluation of the geographical distribution of *Bradypus tridactylus* Linnaeus, 1758 and *B. variegatus* Schinz, 1825. Edentata. 2010(11):53-61.
- Moraes-Barros N, Silva J, Miyaki C, Mortange J. Comparative phylogeography of the Atlantic forest endemic sloth (*Bradypus torquatus*) and the widespread three-toed sloth (*Bradypus variegatus*) (Bradypodidae, Xenarthra). Genetica. 2006;126:189-98.
- Tirira D. Guía de campo de los Mamíferos del Ecuador. Quito: Ediciones Murciélago Blanco. Publicación especial sobre los mamíferos del Ecuador. 6.; 2007.
- Ureña HM, Chacón CR, Faerrón AS, Lizano ST. Hallazgo de *Bradypus griseus* y *Choloepus hoffmanni* (Edentata: Bradypodidae) en tierras altas de Costa Rica. Rev Biol Trop. 1986(34):165-6.
- Moreno S, Plese T. The illegal traffic in sloths and threats to their survival in Colombia. Edentata. 2006;6:10-8
- Vaughan C, Ramírez O, Herrera G, Guries R. Spatial ecology and conservation of two sloth species in a cacao landscape in limón, Costa Rica. Biodivers Conserv. 2007 2007/07/01;16(8):2293-310.
- Bezerra BM, Souto AS, Halsey LG, Schiel N. Observation of brown-throated three-toed sloths: mating behaviour and the simultaneous nurturing of two young. J Ethol. 2008(26):175-8.
- Montgomery GG, Sunquist ME. Impact of sloths on Neotropical forest energy flow and nutrient cycling. In: Golley F, Medina E, editors. Tropical Ecological Systems; Trends in Terrestrial and Aquatic Research. Berlin: Springer-Verlag; 1975. p. 69-98.
- Eisenberg J, Thorington R. A preliminary analysis of a neotropical mammal fauna. Biotropica. 1974;5(3):150-61.
- Carrillo-Bilbao G, Martín-Solano S. Nuevo registro de distribución de *Atelopus spumarius* Cope, 1871 (Anura:Bufonidae) para Ecuador. Latin American Journal of Conservation. 2013;3(2):48-50.
- Fernandez-Duque E, Rotundo M. Field Methods for Capturing and Marking Azarai Night Monkeys. International Journal of Primatology. [10.1023/A:1026284430453]. 2003 2003/10/01;24(5):1113-20.
- Fernandez-Duque E, Di Fiore A, Carrillo-Bilbao G. Behavior, Ecology, and Demography of *Aotus vociferans* in Yasuni National Park, Ecuador. Int J Primatol. 2008 Received: 1 June 2007 / Accepted: 27 October 2007 / Published online: 2 April 2008;29:421-31.
- Carrillo-Bilbao GA, Di Fiore A, Fernández-Duque E. Dieta, Forrajeo y Presupuesto de Tiempo en Cotoncillos (*Callicebus discolor*) del Parque Nacional Yasuní en la Amazonia Ecuatoriana. Neotropical Primates. 2005;13(2):7-11.
- Carrillo-Bilbao GA, Bravo JJ, Schwindt DM, Di Fiore A, Fernández-Duque E, editors. Comparative socioecology of monogamous primates in the Amazon and Gran Chaco poster 2004. IPS; 2004; Italy.
- Silva SM, Clozato CL, Moraes-Barros N, Morgante JS. Towards a standard framework to describe behaviours in the common-sloth (*Bradypus variegatus* Schinz, 1825): novel interactions data observed in distinct fragments of the Atlantic forest, Brazil. Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia. 2013 Aug;73(3):527-31.
- Carvajal-Nieto P, Giraldo A, Plese T. Densidad Poblacional y algunos aspectos de uso de hábitat del perezoso de tres dedos (*Bradypus variegatus*) en un ambiente insular del Chocó Biogeográfico Colombiano bolcimentushistnat. 2013;17 (1)(1 enero - junio):101 - 10.
- Montgomery G, Sunquist M. Habitat Selection and Use by Two-toed and Three-toed Sloths. In: Montgomery G, editor. The Ecology of Arboreal Folivores. Washington, D.C: Smithsonian Institution Press.; 1978. p. 329-59.
- Falconi N, Vieira EM, Baumgarten J, Faria D, Fernandez Giné GA. The home range and multi-scale habitat selection of the threatened maned three-toed sloth (*Bradypus torquatus*). Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde. 2015 9//;80(5):431-9.
- Ballesteros C J, Reyes C K, Racero C J. Estructura poblacional y etología de *Bradypus variegatus* en fragmento de bosque seco tropical, Córdoba-Colombia. Revista MVZ Córdoba. 2009;14:1812-9.
- Castro-Vásquez L, Meza M, Plese T, Moreno-Mora S. Activity Patterns, Preference and use of Floristic Resources by *Bradypus variegatus* in a Tropical Dry Forest Fragment, Santa Catalina, Bolívar, Colombia. Edentata. 2010 2010/11/01:62-9.
- Ramírez O, Vaughan C, Herrera G, Guries R. Temporal and spatial resource use by female three-toed sloths and their young in an agricultural landscape in Costa Rica. Revista de Biología Tropical. 2011;59(4):1743-55.
- Chiarello AG. Diet of the Atlantic forest maned sloth *Bradypus torquatus* (Xenarthra: Bradypodidae). Journal of Zoology. 1998;246(1):11-9.
- Acevedo-Quintero J, Sánchez D, Plese T. Abundancia y Preferencia de Hábitat de *Bradypus variegatus* y *Choloepus hoffmanni* Durante la Época Seca en dos Fragmentos de Bosque Seco en Arboletes, Antioquia, Colombia. Edentata. 2011 2011/12/01;12(1):36-44.
- Hayssen V. *Bradypus variegatus* (Pilosa: Bradypodidae). Mammalian Species. 2010 2010/01/25:19-32.
- Hirsch A, Chiarello AG. The endangered maned sloth *Bradypus torquatus* of the Brazilian Atlantic forest: a review and update of geographical distribution and habitat preferences. Mammal Review. 2012;42(1):35-54.
- Moraes-Barros N, Chiarello A, Plese T, editors. *Bradypus variegatus*. Página de Internet <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T3038A47437046.en>. Consultada 10-October-2015; 2014.

Recibido: 16 de abril de 2016.

Aprobado: 20 de mayo de 2016.

## INVESTIGACIÓN

## Biological activity of a new Growth hormone secretagogue: study in fish and murine cell line

### La actividad biológica de un nuevo secretagogo de la hormona de crecimiento: estudio en el pescado y la línea celular murina

Rebeca Martínez<sup>1</sup>, Katerina Gonzalez<sup>2</sup>, Alain Gonzalez<sup>1</sup>, Kenia Ubieta<sup>1</sup>, Fidel Herrera<sup>1</sup>, Osvaldo Reyes<sup>3</sup>, Hilda Garay<sup>3</sup>, Ayme Oliva<sup>1</sup>, Elsa Rodriguez<sup>1</sup>, Mario Pablo Estrada<sup>1</sup>

#### ABSTRACT

Growth hormone (GH) has pleiotropic functions in all vertebrates. In addition to its essential role in the regulation of body growth and development, it can also influence reproduction, immunity, osmoregulation, and behavior. Immune and neuroendocrine systems have bidirectional communications and it is well documented the enhancing action of GH on teleost immune system. It is desirable controlled GH administration to allow growth and stimulation of the innate immune system of fish. In this study, we have characterized a chemical peptide compound, A228, designed by molecular modeling, which is able to perform the function of a GH peptide secretagogue. In pituitary cell culture, the peptide A228 induces GH secretion. It is able to increase superoxide production in tilapia peripheral blood leukocytes cultures and in a macrophage cell line J774 from mice, therefore using this molecule, innate immune system stimulation is obtained in vitro both in fish and in mammals cell cultures. In this paper is also shown the biological action in vivo of the molecule, to assess growth stimulation in tilapia larvae.

**Keywords:** Biological activity, Growth hormone secretagogue, murine cell line.

#### RESUMEN

La hormona del crecimiento (GH) tiene funciones pleiotrópicas en todos los vertebrados. Además de su papel esencial en la regulación del crecimiento y el desarrollo del cuerpo, sino que también puede influir en la reproducción, la inmunidad, la osmorregulación, y el comportamiento inmunológico y los sistemas neuroendocrinos tener comunicaciones bidireccionales y es documentado bien la acción de mejorar la GH sobre el sistema inmune teleosteo. Es la administración de GH controlada deseable permitir el crecimiento y la estimulación del sistema inmune innato de los peces. En este estudio, hemos caracterizado un compuesto peptídico química, A228, diseñado por modelado molecular, que es capaz de realizar la función de un péptido secretagogo de GH. En el cultivo de células pituitaria, el A228 péptido induce la secreción de GH. Es capaz de aumentar la producción de superóxido en tilapia periféricas culturas leucocitos de la sangre y en una línea celular de macrófagos J774 de ratones, por lo tanto, el uso de esta molécula, la estimulación del sistema inmune innato se obtiene in vitro tanto en los peces y en cultivos de células de mamíferos. En este documento también se muestra la acción biológica in vivo de la molécula, para evaluar la estimulación del crecimiento en larvas de tilapia.

**Palabras clave:** actividad biológica, secretagogo, hormona del crecimiento, línea celular murina.

#### Introduction

Growth hormone (GH) is a pluripotent hormone with essential role in the regulation of body growth and development; it can also influence reproduction, immunity, osmoregulation, and behavior (1). It is produced by the pituitary gland in teleosts as in other vertebrates. GH gene is also expressed in other tissues of fish, especially in lymphoid organs and cells (2). The expression of GH is tightly regulated by several factors.

There are have been demonstrated the interactions among elements of the endocrine and immune systems in fish. And it is desirable controlled GH

administration to allow growth and stimulation of the innate immune system of fish.

The innate response is the basis of the immune defence of invertebrates and lower vertebrates. In fish, the innate immune response has been considered the essential component in combating pathogen invasions due to the limits placed on their adaptive immune response. (3) The macrophage cell lineage represents an important group of cells which play a central role in the initiation and coordination of the immune response.

Among the different peptides involved in the regulation of expression of GH are the GHS. The synthetic GH secretagogues (GHSs) consist of a family of

<sup>1</sup> Biotechnology Animal Division, Aquatic Biotechnology Department, CIGB, PO Box 6162, Havana 10600, Cuba.

<sup>2</sup> Escuela Cs. Ambientales, Laboratorio Fisiología de Peces. Universidad Católica de Temuco. Chile.

<sup>3</sup> Physico-Chemistry Division, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, PO Box 6162, Havana 10600, Cuba.

Correspondence: Rebeca Martinez. Email: rebeca.martinez@cigb.edu.cu

ligands, first described by Momany et al. 1981(4). Multiple efforts have been directed toward finding the active molecules, yielding the discovery of new GHSs (5). GHS bind to a receptor inducing calcium mobilization, named GHS receptor (GHSR) first identified in pigs and humans, but currently GHS receptor (GHSR) has been identified in teleosts and birds (6,7,8,9). The ligand endogenous of this receptor correspond to the ghrelin hormone, which elicits a diverse biological action besides increasing GH secretion from the anterior pituitary gland, enhancing anabolic effects such as increasing appetite, adiposity and blood glucose, enhancing gastric function and increasing cardiac output via GHS-R. GHS-R is expressed predominantly in the brain and pituitary, but it is also expressed in many peripheral organs such as the heart, lungs, liver, kidneys, pancreas, stomach, small and large intestines, adipose tissue and immune cells

The molecule A228 was described by the exhaustive molecular modeling of the human GRLN receptor using bioinformatics tools, after which a virtual library was built and a massive docking experiment was performed against the receptor model (10).

Previous results have demonstrated the biological activity of another GHS, the peptide A233, that induces GH secretion and it is also able to increase superoxide production in tilapia head-kidney leukocyte cultures. This effect is blocked by preincubation with the GHS receptor antagonist [D-Lys3]-GHRP6 and GH immunoneutralization experiments propose a GH-mediated mechanism for the action of A233. The *in vivo* biological action of the decapeptide was also demonstrated for growth stimulation in fish larvae and the enhancement of some parameters of innate immune system in the treated larvae.

The aim of this study was to assess the biological activity of another GHS, the synthetic peptide A228 as a stimulator of growth and the innate immune system of teleosts fish, through studies performed *in vitro* and *in vivo*. It is also interesting to know if in a murine macrophage cell line J774, the A 228 could stimulate the superoxide anion production.

## Methods

### Fish

Tilapia (*Oreochromis sp.*) juvenile and larvae were obtained from the Center for Aquaculture of Mamposto 'n

(CPAM). Fish were kept alive in aerated freshwater under a 12 h light:12 h darkness photoperiod. They were fed commercial dry diet for fish (CENPALAB, Habana, Cuba). Water temperature was maintained at 26 and 28 °C. All animal experiments were previously approved by the Ethics Committee of the Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Havana, Cuba.

### GH secretagogues

The decapeptide A228 (GKFGDLSPEHQ) y A233 (GKFDLSPEHQ) with an internal lactam bond between side chains of underlined amino acids) was manually synthesized on a solid-phase support. Crude peptide was purified by reverse-phase, high-performance, liquid chromatography up to 95% on a C-18 preparative column with an acetonitrile/water linear gradient. Trifluoroacetic acid was used in both solvents for counter-ion pair formation. The correct sequence of the purified peptide was confirmed by electrospray mass spectrometry (Micromass, Manchester, UK). The positive control used was GHRP6 (Lipotec, Barcelona, Spain) lyophilized peptides were reconstituted in PBS.

### Primary culture of pituitary cells

The *in vitro* effects of A233 GHS were examined using cells dispersed from whole pituitary. Mature tilapias of both sexes

weighing 300–500 g were used after anesthesia in tricaine methanesulfonate (MS-222, Sigma). Pituitaries were collected aseptically in isotonic medium (Krebs bicarbonate-Ringer solution, 330 m Osmolal, pH 7.4) supplemented with penicillin (100 IU/ml), streptomycin (0.1 mg/ml), and nystatin (250 IU/ml, all from Sigma). The pituitaries were diced with a sterile razor blade and treated with collagenase for 1 h at room temperature in 2.5 ml trypsin-EDTA solution (0.25% trypsin/0.02% EDTA in PBS, pH 7.4). Tissues were

aspirated repeatedly through a pipette during enzymatic treatment to promote dissociation of cells. The process was terminated by the addition of 0.5 ml (20%) fetal bovine serum (Sigma). Cells were counted on a hemocytometer under a light microscope and viability determined by trypan blue exclusion. Viability of the cells was always >95%. Cells were then plated at a density of 4.0 × 10<sup>5</sup> cells/well into a 24-well plate (Falcon, Primaria 24, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) at a volume of 300 µl/well of isotonic medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The cells were preincubated for 4 days at 26–28 °C under a humidified atmosphere of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>, with one change of culture medium at 48 h post-plating. Before each experiment, cells were washed once with serum-free medium. A final 300 µl serum-free medium was added containing A233, GHRP6 (Lipotec), or control medium without hormones. The medium was replaced at 4 h. Incubations were terminated at 8 h, and hormone release was quantified for the 0–4 and 4–8 h intervals. GH release was expressed as secretion per unit volume of medium (ng/ml).

### GH assays

The GH secreted *in vitro* was measured using a noncompetitive ELISA as described by Lugo et al. 2008 (11). The 96-well MaxiSorp plates (Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark) were coated (3 h at 37 °C) with anti-tilapia GH monoclonal antibody 1 (tiGH1 mAb; CIGB, Santi Spiritus, Cuba) at 10 mg/ml in 0.05 M carbonate buffer (pH 9.6, 100 µl/well). The plates were washed two times with PBS-T (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, and 0.05% Tween 20, pH 7.3) and blocked with 3% skim milk (Oxoid, Cambridge, UK) in PBS 1 (200 µl/well) for 1 h at 37 °C. A standard tiGH curve in the range of 35–0.136 ng/ml was obtained by twofold dilutions in 0.5% skim milk in PBS 1, dispensed by duplicate in the same plate. Test samples were diluted at a ratio of 1:2 as described earlier and were incubated on the plates overnight at 4 °C. After washing the plates four times with PBS-T, 100 µl HRP – tiGH2 mAb conjugate (CIGB), diluted at a ratio of 1:15 000 in PBS 1 containing 0.5% skim milk, were added to each well. The plates were incubated for 1 h at 37 °C and then washed eight times with PBS-T. Then, the substrate buffer (0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 M citric acid (pH 5.0) containing 0.5 mg/ml ortho-phenylenediamine and 5 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was added (100 µl/well). The reaction was stopped 15 min later by adding 50 µl of 2.5 M sulfuric acid per well. The absorbance was measured at 492 nm using the Titertek Multiskan Plus spectrophotometer. The accepted upper limit of the assay background was 0.094. The lower detection limit of the assay was 0.1 ng/ml. The degree of variation and intra- and interassay coefficients of variation are 3.90 and 13.45% respectively.

### Isolation and culture of leukocytes

Peripheral blood leukocytes were isolated as described by Acosta et al, 2010(12). Tilapias were anesthetized in tricaine methanesulfonate (MS222), and blood was collected from the caudal vessels using a heparinized syringe. Blood was diluted 1:2 in RPMI-1640 medium, containing 4 µg/mL of gentamicin. The mixture was placed on Ficoll-Paque™ Research Grade (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) and centrifuged at 400 g for



25 min. The leukocyte band was harvested, washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.6), and suspended in RPMI-1640 medium with 0.5% tilapia serum, and cultured at 25 °C, in 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. Leukocyte viability was assessed by trypan blue exclusion (viability N95%).

### Growth conditions for macrophage cell line J774

Murine macrophage cell lines J774 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The cells were cultured as monolayers in Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) F12 supplemented with 20% fetal bovine serum, 100 mg/mL penicillin/streptomycin, and 2mM L-glutamine (Mediatech, Inc., Herndon, VA) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The cultured cells were grown to 70–80% confluence in 75 cm<sup>2</sup> flasks for preparation of samples that were used in further analysis.

### Superoxide production in cell culture

To analyze the effect of GHSs on the immune system, the superoxide anion was measured in tilapia PBLs and macrophage cell line J774 as the reduction of NBT (Sigma) as described by Yada et al. 2006 (13)

### Growth performance experiment

The growth promoting activity of A233 was evaluated in tilapia larvae (*Oreochromis sp.*) of 0.007G0.001 g mean weight and (n=200). The effect was compared with GHRP6 as positive control. The fish were acclimated at 28 °C in 120 l tanks with running fresh water for 1 week before the experiment. They were fed with a basal diet to satiation twice a day. Before treatment, the tanks were cleaned. The fish were immersed into each treatment for 60 min without water recirculation. The immersion procedure was performed three times a week, for a period of 1 month. Three experimental groups were handled with the following treatments: groups 1 and 2 received the peptides A228 and GHRP6 (positive control) at a dose of 0.1 mg/l, respectively, and a no treated group in the third one. Growth-promoting effects were evaluated by measuring the body weight increase.

### Statistical analysis

Results were evaluated using GraphPad Prism version 4.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA. All results are expressed as the mean ±S.D. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA by Newman-Keuls's or Dunnett's method for data with normal distribution and equal variances: GH assays, superoxide production, growth performance experiment of tilapia (*Oreochromis sp.*) larvae. Data with unequal variances were analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons post-test. Treatments were considered to be significantly different if P<0.05.

## Results

The molecules A 228 and A233 (Fig. 1A) were selected from the virtual libraries described by Rodriguez et al. 2007(10), and, in order to determine in vitro and in vivo whether this novel mimetic molecules function as GHSs, the following assays were conducted on the growth and immune system.

### GH in vitro assays using pituitary cell culture

To evaluate the effect of A228 and A233 peptide on GH secretion, we performed an in vitro culture of cells in the pituitary gland of tilapia (*Oreochromis sp.*). the peptides at a concentration of 10 nM stimulated GH secretion at 8 h by cells in the anterior pituitary gland (Table). The stimulatory effect of GRLN and

GHSs on the release of GH in vitro by the pituitary gland has been reported in mammals, birds, and different species of fish (14,15,16, 17, 18).

Determination and characterization of superoxide anion induction in PBLs and macrophage cell line J774

Superoxide anion produced by cultured tilapia (*Oreochromis*

**Table.** Effects of the A233 on GH secretion by cultured tilapia pituitary cells. Experiments were tested in triplicate with pituitaries from six animals. Data represent arithmetic mean of the tilapia GH±S.D

Experimental groups	GH (ng/ml)
Control	0.12 58 ± 0.033
GHRP-6 (10 nM)	0.4238 ± 0.057**
A233 (10 nM)	0.3424 ± 0.083*
A228 (10 nM)	0.3134 ± 0.10*

\* Statistical differences with respect to the control \* (p <0.05) and \*\* (p<0.01)

mis sp.) PBLs were measured by the addition of A 228 as positive control GHRP-6 was included and also A233, which in previous results was capable of enhance superoxide anion production in leukocytes from tilapia head kidney. The peptides induced significant increases in superoxide production. The concentration of peptide used was 10 n M taking in consideration previous results ( 19 ) , The increase of superoxide anion production was statistically higher in cells stimulated with the peptides, to compare with no treated cells, among the different treatments there were not statistical differences, in both cultures, PBLs ( Figure 2 ) this effect is similar to that reported by Acosta et al. 2010,(12) who stimulated phagocytic peripheral blood cells of tilapia (*Oreochromis sp.*) with recombinant tiGH (*Oreochromis hornorum*).

The results obtained in the production of superoxide anion with the macrophage cell line J774.after the stimulation with the peptides, were very similar, there were obtained statistically differences in the superoxide anion production of cells treated with the peptides , and compare with negative control. (Figure 3)

### In vivo biological activity assays

Experiments were performed to evaluate the biological effect of the peptide on the growth rate of tilapia larvae. The effect of these peptides on fish growth was determined by measuring the increase in body weight. The tilapia larvae treated with A228 showed a significant increase in body weight compared with the controls as well as the larvae treated with GHRP -6 , just 9 days after treatment.

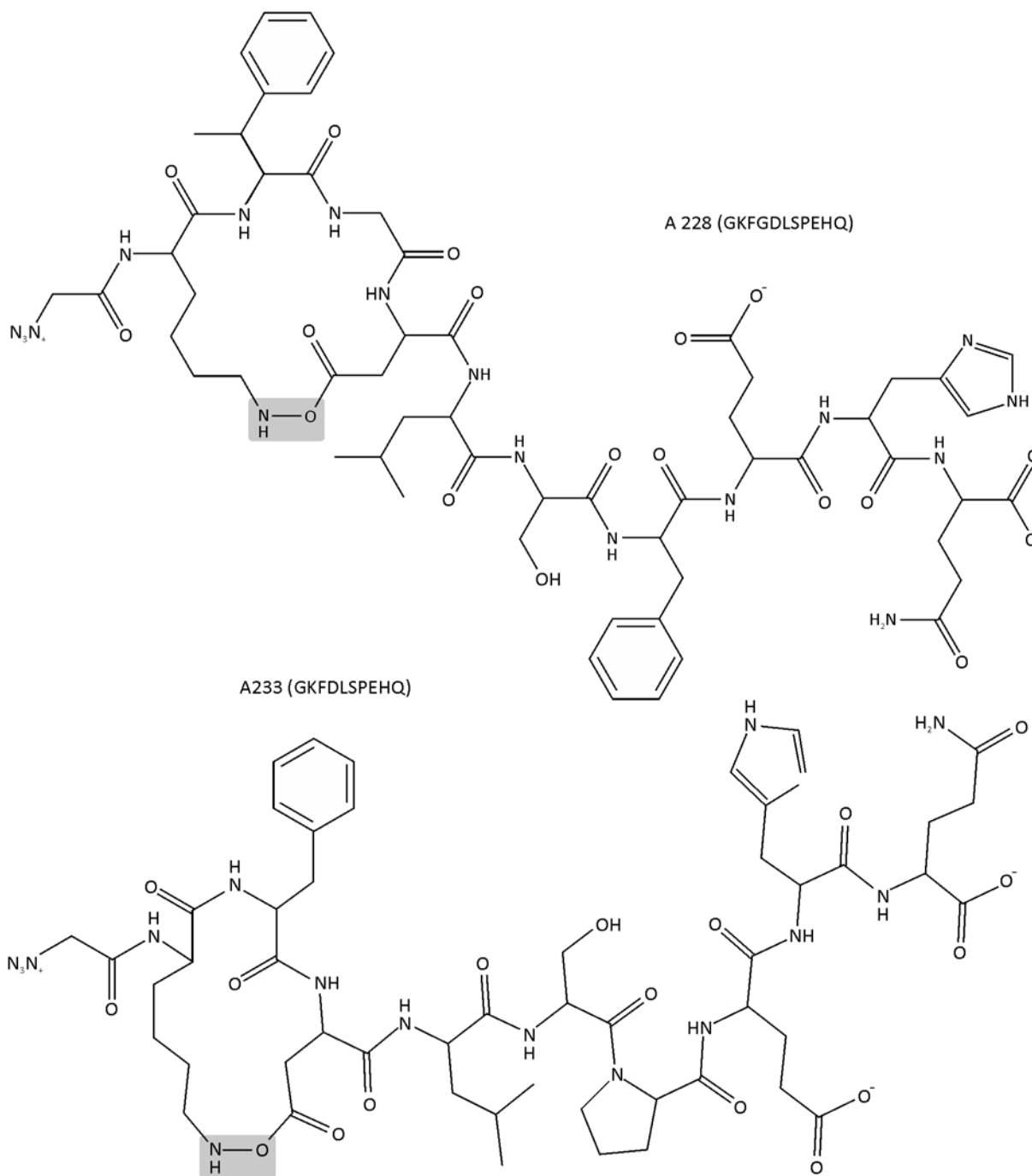
## Discussion

In this study, we demonstrate the effect of another peptide molecule having internal cycles and composed solely of L-amino acids that are capable of exerting, due to their chemical structure, similar functions to those attributed to GRLN, des-acyl GRLN, and other peptidic GHS. They are a group of peptide compounds and peptides capable of stimulating production and GH secretion in vitro and in vivo.

There were not differences between both peptides A228 and A233, the structural difference do not interfere on GH secretagogue function at least in this kind of primary culture of pituitary cells experiment.

Our results are similar to those obtained in tilapia (*Oreochromis mossambicus*), where the effect of GRLN on GH secretion in vitro was dependent on the concentration of the endogenous secre-





**Fig. 1.** 2D representation of the peptide amide A228 (GKFGDLSPEHQ) and A233 (GKFDLSPEHQ), with an internal lactam bond between side chains of underlined amino acids. The lactam bond between Lys and Asp was formed during the synthesis procedure on solid-phase support and is essential for the biological activity of the molecule.

tagogue used (15). Other researchers have reported the stimulatory effect of the synthetic peptides GHRP-6, PACAP, and PACAP-related peptide from *Clarias gariepinus* on the release of GH in vitro by the pituitary gland of tilapia (*Oreochromis niloticus*); (11,19). There should be conducted an experiment using the A228 peptide to study the GH releasing in vivo after the administration of GHS.

It has been reported that the immune system of both fish and mammals possesses both non-specific and specific immune responses with cellular and humoral components. However, fish depends more heavily on non-specific defence mechanisms. The use of immunostimulants given as dietary supplement can improve the innate defense of aquatic animals principally fish and thus providing resistance to pathogens during period of stress, such as grading, sea transfer and vaccination.

Neutrophils and macrophages are known as the phagocytic leucocytes in fish peripheral blood (20). Macrophages play a key role in the host immune system. They are in the first line of defence, participating in detection and identification of potential pathogens. As part of mechanisms involved in the innate system they respond to stimuli activating phagocytosis and releasing reactive oxygen and nitrogen species which destroy microbes. They also initiate the inflammatory response through cytokine production, and furthermore, macrophage acts a link between the innate and adaptive immune responses acting as antigen-presenting cells to prime T cells. (21)

The existence of the binding sites of GH has been shown in both types of leucocytes in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. It is known also that the administration in vivo and in vitro GH

stimulates the production of superoxide anion after phagocytosis as a mechanism for elimination of pathogens (2)

In our result we could state the biological action of or peptide in fish and mammals system, There are controversial reports about the effects of ghrelin on phagocytotic activity of leukocytes. In fish (rainbow trout), the administration of ghrelin increased phagocytosis and superoxide production in zymosan-stimulated leukocytes, which was abolished by pretreatment of leukocytes with a GHS-R antagonist (2). It was also shown that ghrelin increased mRNA levels of superoxide dismutase and GH in leukocytes, suggesting that the effects of ghrelin was mediated, at least in part, by stimulating GH secretion from leukocytes. On the other hand, ghrelin administration reportedly reduced the elevated phagocytic activity of peritoneal macrophages induced by acute cold-restraint stress in rats (22). In our study we have found an increase of superoxide anion in fish PBL and cell line J774 from murine macrophages after A228 stimulation even has been reported that ghrelin modulates phagocytosis directly or indirectly via GH, but in a different way in different species it should be considered the treatment conditions to evaluate this biological activity.

GHSs are useful molecules as growth enhancement molecules. These synthetic molecules are effective in stimulating production and release of endogenous hormone as a physiological response, with no side effects on the pituitary or toxicity potential; besides their low molecular weight, it makes a better entrance to the organism.

In our laboratory, we have successfully employed the immersion bath technique to study the effects of nutritional supplements and growth factors on growth control and the immune system in fish (12). The immersion bath method used for our studies requires little manipulation and causes minimum stress to fish during treatment. There is evidence suggesting that the gill pillar cells are a possible entry site for some molecules when fish are treated by immersion bath (6).

This study evaluated the biological function of synthetic peptide A228 on weight gain of tilapia (*Oreochromis sp.*). Tilapia larvae showed a significant increase in growth after 9 days of treatment

with peptide A228 (0.1 mg/l). All animals received the same commercial diet, so the increase in weight and height is due to the administration of peptide A228. The positive control group represented by the fish treated with the peptide GHRP6 significantly increased their growth. Similar results were obtained in a former work to administrate A233 peptide, another GHS, to fish larvae enhancing growth and some humoral innate immune system parameters (19)

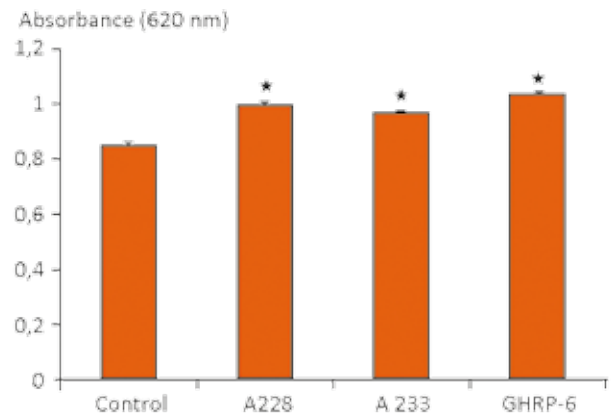
These results are similar to those found in mice where there was an increase in body weight after dosing by s.c. injection of the synthetic peptide GHRP2 (23). In adult rats, GHRP6 also increased body weight (24) as well as other GHSR agonists, like SM-130686 administered orally (25) and BIM-28131 administered by s.c. injection (26). It has been reported that GHSR1a agonist, a pentapeptide with D-amino acids, promotes weight gain in rats, by i.p. administration during 7 days (27). Moreover, the administration, by the same method, of GH tilapia (*O. hornorum*) secreted into the culture supernatant of yeast *Pichia pastoris* (28) to larvae of tilapia (*Oreochromis sp.*), significantly increased growth of these animals. Administration of tilapia recombinant neuropeptide Y (*Oreochromis sp.*) to larvae of African catfish (*C. gariepinus*) also produced an increase in animal weight (29).

In addition, treatment with PACAP and PACAP-related peptide from *C. gariepinus* larvae of African catfish (*C. gariepinus*), tilapia (*O. niloticus*), and common carp (*Cyprinus carpio*) increased body weight and length in three fish species (11).

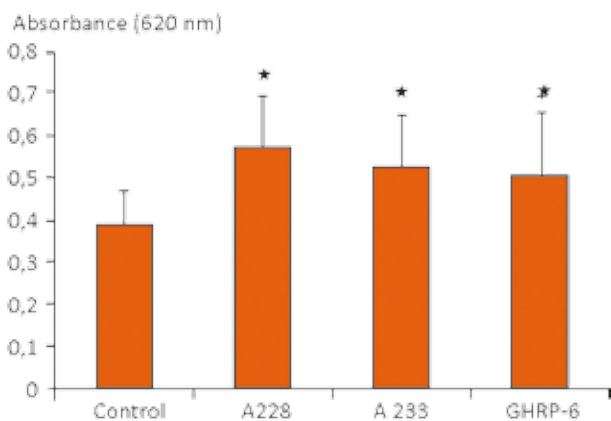
The application of the peptide during the early stages of fish development should be very important, The peptide designed by modeling bioinformatics from human ghrelin receptor and

obtained by chemical synthesis is recognized by the secretagogue receptor GHS-R1a, stimulating the secretion of growth hormone due to the action of tissues of the larvae. It promotes accelerated growth with increased weight concurrently is recognized by immune system cells and stimulates the innate immune response, the main defense mechanism of fish during the early stages of life as a result you can get higher quality larvae

To summarize, the action of this GHS has been assessed employing *in vitro* and *in vivo* methods, we have demonstrated the effect of a new growth hormone secretagogue, A228, as a growth hormone secretagogue, that elicits GH in tilapia pituitary cell culture and also has stimulatory effect on the superoxide anion production on tilapia PBL and a cell line J774 from mice macrophages. To administrate the molecule using immersion baths, the weight gain is enhanced in tilapia larvae. These results support the interrelation between endocrine and immune system.



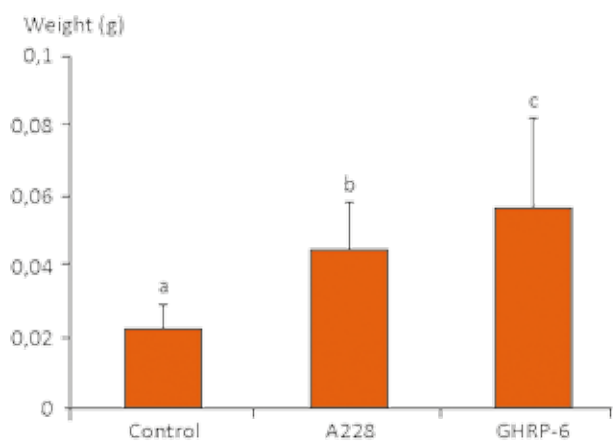
**Fig. 2.** Effects of A228 and A233 on superoxide anion production by tilapia (*Oreochromis sp.*) PBLs. Cells were incubated with the peptides for 4 h at 28 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Cells with Hanks' solution (pH 7.4) were the control. Data are expressed as the absorbance at 620 nm and bars and error bars represent S.D. of the mean (S.E.M., n25). Statistical differences between groups for Newman-Keuls's test.



**Fig. 3.** Effects of A228 and A233 on superoxide anion production in macrophage cell line J774. Cells were incubated with the peptides for 4 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Cells with Hanks' solution (pH 7.4) were the control. Data are expressed as the absorbance at 620 nm and bars and error bars represent S.D. of the mean (S.E.M., n25). Statistical differences between groups for Newman-Keuls's test.

## References

- Devlin R, Sakhrania D, Tymchuk W, Rise M & Goha B. Domestication and growth hormone transgenesis cause similar changes in gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *PNAS* 2009;106: 3047-3052. (doi:10.1073/pnas.0809798106)



**Fig. 4.** Growth promotion experiment in *Oreochromis* sp. larvae immersed in GHRP6 and A228 peptide at a dose of 0.1 mg/l. (A) Effect on length and weight over 9 days of Treatment in fish larvae; samples of 50 animals were weighted at 7 days. The control group did not receive any treatment. Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison post test was used for length and body weight comparisons among groups. Different letters represent statistical significance. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=50).

2. Yada T . Growth hormone and fish immune system. *General and Comparative Endocrinology* 2007; 152 : 353–358. (doi:10.1016/j.ygcen.2007.01.045)
3. Magnadottir B (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunol.* 20: 137–151.
4. Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, Chang D, Hong A & Newlander K Design, synthesis and biological activity of peptides which release growth hormone, in vitro. *Endocrinology* 1981;108 :31–39. (doi:10.1210/endo-108-1-31)
5. Moulin A, Ryan J, Martinez J & Fehrentz JA Recent developments in ghrelin receptor ligands. *ChemMedChem* 2007; 2: 1242–1259. (doi:10.1002/cmdc.200700015)
6. Palyha OC, Feighner SD, Tan CP, McKee KK, Hreniuk DL & Gao YD Ligand activation domain of human orphan growth hormone (GH) secretagogue receptor (GHS-R) conserved from Pufferfish to humans. *Molecular Endocrinology* 2000; 14: 160–169. (doi:10.1210/me.14.1.160)
7. Kaiya H, Kodama S, Ishiguro K, Matsuda K, Uchiyama M, Miyazato M, Uchiyama M, Miyazato M & Kangawa K Ghrelin-like peptide with fatty acid modification and O-glycosylation in the red stingray, *Dasyatis akajei*. *BMC Biochemistry* 2009a ;10: 30. (doi:10.1186/1471-2091-10-30)
8. Kaiya H, Mori T, Miyazato M & Kangawa K 2009b Ghrelin receptor (GHS-R)-like receptor and its genomic organisation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 153 438–450. (doi:10.1016/j.cbpa.2009.04.612)
9. Kaiya H, Riley LG, Janzen W, Hirano T, Grau EG & Miyazato M . Identification and genomic sequence of a ghrelin receptor (GHS-R)-like receptor in the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zoological Science* 2009c ; 26: 330–337. (doi:10.2108/zsj.26.330)
10. Rodríguez R, De la Nuez A, Estrada MP, Martínez R, China G, Reyes O, Fernandez R, Garcia D, Berlanga A & Musacchio A Compounds analogous to growth hormone peptide secretagogues and preparations containing them. 2007 (Patent publication No.: WO 2007/098716 A1).
11. Lugo JM, Rodríguez A, Helguera Y, Morales R, Gonzalez O, Acosta J, Besada V, Sanchez A & Estrada MP Recombinant novel pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) from African catfish (*Clarias gariepinus*) authenticates its biological function as a growth promoting factor in low vertebrates. *Journal of Endocrinology* 2008;197 :583–597. (doi:10.1677/JOE-07-0555)
12. Acosta J, Carpio Y, Morales R, Aguila JC, Acanda Y, Herrera F & Estrada MP New insights into the biological activity and secretion properties of a polypeptide derived from tilapia somatotropin. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 2010; 156: 264–272. (doi:10.1016/j.cbpb.2010.04.001)
13. Yada T, Kaiya H, Mutoh K, Azuma T, Hyodo S, y Kangawa K (2006) Ghrelin stimulates phagocytosis and superoxide production in fish leukocytes. *J. Endocrinol.* 189: 57–65.
14. Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Riley LG, Hirano T, Grau EG & Kangawa K Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity. *Journal of Endocrinology* 2003 a ; 176: 415–423. (doi:10.1677/joe.0.1760415)
15. Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Riley LG, Hirano T & Grau EG. Identification of tilapia ghrelin and its effects on growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 2003b; 135: 421–429. (doi:10.1016/S1096-4959(03)00109-X)
16. Unniappan S & Peter RE In vitro and in vivo effects of ghrelin on luteinizing hormone and growth hormone release in goldfish. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2004; 286: R1093–R1101. (doi:10.1152/ajp-regu.00669.2003)
17. Fox BK, Riley LG, Dorrough C, Kaiya H, Hirano T & Grau EG Effects of homologous ghrelins on the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zoological Science* 2007;24: 391–400. (doi:10.2108/zsj.24.391)
18. Picha ME, Strom CN, Riley LG, Walker AA, Won ET, Jhnstone WM & Borski RJ Plasma ghrelin and growth hormone regulation in response to metabolic state in hybrid striped bass: effects of feeding, ghrelin and insulin-like growth factor-I on in vivo and in vitro GH secretion. *General and Comparative Endocrinology* 2009;161: 365–372. (doi:10.1016/j.ygcen.2009.01.026)
19. Martínez R., Ubieta K, Herrera , F, Forellat, A , Morales R , de la Nuez A, Rodríguez, R, Reyes, O, Oliva , A, Estrada , MP. A novel GH secretagogue, A233, exhibits enhanced growth activity and innate immune system stimulation in teleosts fish *Journal of Endocrinology* 2012; 214 : 409– 419, (doi : 10.1530/JOE-11-0373)
20. Scimbes, C.J., The nonspecific immune system: cellular defenses. In: Iwama, G., Nakanishi, T. Eds. *The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment*. 1996 Academic Press, New York, pp. 63–103. Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey.
21. Janeway CA, Jr Medzhitov R : Innate immune recognition. *Ann Rev Immunol* 2002 ; 20: 197– 216.
22. Hattori N. Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. *Growth Hormone & IGF Research* 2009;19 :187–197. (doi:10.1016/j.gHIR.2008.12.001)
23. Tscho“p M, Statnick MA, Suter TM & Heiman ML GH-releasing peptide-2 increases fat mass in mice lacking NPY: indication for a crucial mediating role of hypothalamic agouti-related protein. *Endocrinology* 2002;143: 558–568. (doi:10.1210/en.143.2.558)
24. Svensson SJ, Lall S, Dickson L, Bengtsson B-A , Romer J, Ahnfelt-Ronne I, Ohlsson C & Jansson J-O The GH secretagogues ipamorelin and GH-releasing peptide-6 increase bone mineral content in adult female rats. *Journal of Endocrinology* 2000; 165: 569–577. (doi:10.1677/joe.0.1650569)
25. Nagamine J, Nagata R, Seki H, Nomura-Akimaru N, Ueki Y, Kumagai K, Taiji M & Noguchi H Pharmacological profile of a new orally active growth hormone secretagogue, SM-130686. *Journal of Endocrinology* 2001; 171: 481–489. (doi:10.1677/joe.0.1710481)
26. Strassburg S, Anker SD, Castaneda TD, Burget L, Perez-Tilve D, Pfluger PT, Nogueiras R, Halem H, Dong J, Culler M et al. Long-term effects of ghrelin and ghrelin receptor agonists on energy balance in rats. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 2008;295:E78–E84. (doi:10.1152/ajpendo.00040.2008)
27. Dong JZ, Zhang J, Taylor JE, Halem H, Datta R, Culler M & Eynon J .GHS-1a agonists that effectively stimulate food intake and body weight gain. *Peptides for Youth: the Proceedings of the 20th American Peptide Symposium, Advances in Experimental Medicine and Biology* 2009; 611: 487–488. (doi:10.1007/978-0-387-73657-0\_210)
28. Acosta J, Carpio Y, Besada V, Farnos O, Morales R, Sánchez A, Curbelo Y, Ayala J, y Estrada MP (2008) Recombinant truncated tilapia growth hormone enhances growth and innate immunity in tilapia fry (*Oreochromis* sp.). *Gen Comp Endocrinol.* 157:49–57
29. Carpio Y, Leon K, Acosta J, Morales R & Estrada MP Recombinant tilapia neuropeptide Y promotes growth and antioxidant defenses in African catfish (*Clarias gariepinus*) fry. *Aquaculture* 2007; 272 :649–655. (doi:10.1016/j.aquaculture.2007.08.024)

**Recibido:** 14 de marzo de 2016.

**Aprobado:** 20 de mayo de 2016.

## INVESTIGACIÓN

## Terapia celular en la necrosis aséptica de la cabeza del fémur en pacientes con drepanocitosis

### Cell therapy in aseptic necrosis of the femoral head in patients with sickle cell disease

Aymara Maria Baganet-Cobas<sup>1</sup>, José Armando Galván-Cabrera<sup>1</sup>, Mariela Forrellat-Barrios<sup>1</sup>, Norma D. Fernández-Delgado<sup>1</sup>, Ana Iris González-Iglesias<sup>1</sup>, Consuelo Macías-Abraham<sup>1</sup>, Rosa María Lam-Díaz<sup>1</sup>, Tania González-Suárez<sup>1</sup>, Inés Maria Tartabull-Matienzo<sup>2</sup>, Porfirio Hernández-Ramírez<sup>1</sup>

## RESUMEN

**Introducción:** la necrosis aséptica de la cabeza femoral (NACF) es una causa importante de morbilidad en pacientes jóvenes con drepanocitosis. En su tratamiento ningún método es completamente satisfactorio. Investigaciones recientes sugieren que la terapia celular puede contribuir a la reparación de tejidos como el óseo resultando útiles en el proceso de osteogénesis y angiogénesis. **Objetivo:** evaluar la utilidad del implante de concentrado de células mononucleares autólogas de médula ósea (CMN-MO) en el tratamiento de la NACF en pacientes con drepanocitosis. **Método:** se incluyeron 18 pacientes, con una edad promedio de 32,8 años (rango entre 21 y 46 años), con un seguimiento mínimo de dos años. A todos se les realizó descompresión de la cabeza femoral por perforación e implante de CMN-MO. A estas células se les cuantificó por citometría de flujo expresión de moléculas CD34, CD45, CD117, HLADR, CD29 y CD14. **Resultados:** el promedio de viabilidad del concentrado implantado fue del 97%. Fenotípicamente las CMN-MO mostraron un patrón de expresión asociado a poblaciones de células madre adherentes del estroma medular CD34-/CD45-/DR-/CD29+/CD14-/CD117-. Los mejores resultados clínicos y radiográficos se observaron en pacientes en estadios iniciales (I o II) de la enfermedad. En 12 caderas (72,9 %) tratadas, los pacientes no refirieron ningún dolor a los dos años posteriores al tratamiento. Se obtuvieron buenos resultados radiológicos en siete pacientes (41,2 %). Tres pacientes (17,6 %) requirieron el remplazo total de cadera. **Conclusiones:** el implante de CMN-MO para los primeros estadios de la NACF, es un tratamiento útil en los pacientes con drepanocitosis. El método empleado es relativamente simple y poco costoso.

**Palabras clave:** necrosis aséptica de cadera, perforaciones de la cabeza femoral, células madre adultas, células mononucleares, médula ósea, medicina regenerativa, anemia drepanocítica, Cuba.

## ABSTRACT

**Introduction:** Aseptic necrosis of the femoral head (NACF) is an important cause of morbidity in young patients with sickle cell disease. In any treatment method it is completely satisfactory. Recent research suggests that cell therapy can help repair tissue such as bone proving useful in the process of osteogenesis and angiogenesis. **Objective:** To evaluate the usefulness of implant concentrated autologous mononuclear bone marrow cells (BM-MNCs) in the treatment of patients with sickle cell disease NACF. **Method:** 18 patients were included, with an average age of 32.8 years (range 21 to 46 years) with a minimum follow-up of two years. All underwent decompression of the femoral head by drilling and implant CMN-MO. These cells were quantified by flow cytometry expression of CD34 molecules, CD45, CD117, HLA-DR, CD29 and CD14. **Results:** The average viability of the implanted concentrate was 97%. Phenotypically BM-MNCs showed an expression pattern associated with populations of adherent stem cells marrow stromal CD34 / CD45 / DR / CD29 + / CD14- / CD117-. The best clinical and radiographic results were observed in patients in early stages of the disease (I or II). In 12 hips (72.9%) treated patients did not report any pain at two years after treatment. Radiologic good results were obtained in seven patients (41.2%). Three patients (17.6%) required total hip replacement. **Conclusions:** The implantation of BM-MNCs for the early stages of the NACF, is a useful treatment in patients with sickle cell disease. The method is relatively simple and inexpensive.

**Keywords:** aseptic necrosis of the hip, femoral head perforations, adult stem cells, mononuclear cells, bone marrow, regenerative medicine, sickle cell anemia, Cuba. Introducción

La necrosis aséptica de la cabeza femoral (NACF) también conocida como osteonecrosis, necrosis avascular, necrosis ósea isquémica es una de las causas más importantes de morbilidad en los pacientes con drepanocitosis. Frecuentemente afecta a pacientes en la tercera o cuarta décadas de la vida. Internacionalmente su

prevalencia se estima entre el 4 y el 20 % y en estudios realizados recientemente en nuestro centro es de 11 %. (1-4) Tiene una alta incidencia bilateral y en su fase final puede llevar a la destrucción temprana de la articulación, con necesidad de remplazo total de cadera. (5-7) A pesar de los adelantos de las ciencias médicas,

1 Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

2 Hospital General Docente "Enrique Cabrera". La Habana, Cuba.

**Correspondencia:** Dra. Aymara Maria Baganet Cobas. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado Postal 8070, La Habana, CP 10800. Cuba  
E-mail: aymara.baganet@infomed.sld.cu



la comprensión de la patogenia y etiología de la NACF continúa siendo un diagnóstico desafiante y un dilema terapéutico.

Varios estudios han analizado la historia natural de la NACF y la asociación con los esteroides y abuso del alcohol,(8-10) pero son pocos los artículos que estudian la historia natural de la NACF en los pacientes adultos con drepanocitosis. Se conoce que la progresión de la NACF en pacientes con drepanocitosis es más frecuente y más rápida que cuando se asocia a otras causas de osteonecrosis.(1, 4, 11, 12) El diagnóstico precoz es fundamental dado que la historia natural de esta complicación es hacia la progresión. En general, la mayoría de los estudios han demostrado que el tratamiento conservador no impide el colapso de la cabeza femoral en más del 85 % de los casos.(13-15) De no ser tratada, la destrucción de la cabeza femoral se observa en el 87% de los pacientes con drepanocitosis en los primeros cinco años de diagnosticada la complicación. Generalmente el inicio de esta dolencia se produce en pacientes jóvenes por lo que se recomiendan tratamientos encaminados a la preservación de la articulación desde los estadios iniciales de la NACF dado los pobres resultados a largo plazo de la artroplastia total de cadera.(16-18)

Durante las últimas tres décadas, uno de los tratamientos quirúrgicos más extendidos en las fases tempranas de la NACF y encaminado a la preservación de la articulación, son las perforaciones de la cabeza del fémur.(2, 13, 19)

En 1964, Arlet y Ficat,(20) propusieron que las perforaciones centrales de la cabeza femoral permiten descomprimir la cámara rígida intraósea, a la vez que favorece el retorno venoso y así se promueve la revascularización de la cabeza femoral. Ficat en 1985, Smith en 1995 y Aigner en 2002, informaron buenos resultados con el uso de este procedimiento.(21-23) Además se conoce que en los pacientes con NACF el número de células mesenquimales y los compartimientos del estroma de la médula ósea (MO) están deprimidos, y la capacidad osteoblástica de las células está disminuida.(24, 25) Este hallazgo sugirió la posibilidad de que las células mononucleares de la médula ósea (CMN-MO) pudieran implantarse en una lesión necrótica de la cabeza femoral, ya que contiene células del estroma que tienen muchas de las características de las células madre.(26-28)

En los últimos años el desarrollo y aplicación de novedosos métodos terapéuticos en particular la terapia celular o regenerativa, con el empleo de las células madre autólogas adultas ha permitido ampliar el espectro de tratamiento y lograr la mejoría para muchos padecimientos con escasas posibilidades terapéuticas. Estas células son capaces de diferenciarse hacia líneas celulares de diferentes tejidos; siendo utilizadas tanto en pacientes con isquemia de miembros inferiores como en pacientes con cardiopatía isquémica;(29-32) lo que ha impulsado a una nueva especialidad, la medicina regenerativa, cuyo desarrollo está unido estrechamente con los nuevos conocimientos relacionados con las propiedades de las células madre embrionarias y adultas, así como al potencial regenerativo y terapéutico proporcionado por las células madre. Esta capacidad, a menudo reconocida con el término de plasticidad, ha despertado el interés, de la comunidad científica internacional.(33-36)

Tomando en cuenta la ausencia casi total de reacciones adversas como consecuencia de este tratamiento en pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores, que incluye los estudios realizados en nuestro país,(37, 38) se consideró que este proceder podría aplicarse para beneficiar a pacientes con drepanocitosis, que tienen ya una afectación ósea lo suficientemente importante como para que se manifieste clínicamente con dolor a la marcha y limitación de algunos movimientos de la cadera y que además no sean tributarios de recibir una cirugía. Se conoce que si estos pacientes no reciben algún tipo de tratamiento avanzarán inexorablemente hacia el empeoramiento de la complicación y una proporción no despreciable de ellos a la larga engrosarán la lista de los pacientes que requerirán remplazo protésico total.

A partir de estos antecedentes se realizó un estudio para evaluar el uso del implante de CMN-MO autólogas en pacientes con

drepanocitosis y NACF y evaluar el tiempo en que se alcanza la mejoría clínica en aras de ofrecer a estos pacientes una opción terapéutica más y contribuir a elevar su calidad de vida.

## Métodos

Desde febrero del 2007 a marzo de 2012 se realizó un estudio piloto, cuasiexperimental, aleatorio con seguimiento médico mínimo de dos años posteriores al implante. Se incluyeron 18 pacientes con drepanocitosis atendidos en la consulta de ortopedia del Instituto de Hematología e Inmunología. Todos tenían diagnóstico de NACF según la clasificación de Ficat,(20) que es un sistema de clasificación de cuatro estadios en base a los cambios radiográficos de la cadera (estadio I, normal; estadio II, presenta lesiones escleróticas o quísticas; estadio III, presenta colapso subcondral y estadio IV, disminución del espacio articular con lesiones degenerativas). En todos los casos habían sido tratados previamente sin éxito por los métodos habituales y no eran tributarios de recibir una cirugía. El diagnóstico de la NACF se confirmó por exámenes radiográficos simples y gammagrafía con tecnecio 99 (99Tm). Se les implantaron CMN-MO por vía intraósea. Se excluyeron los casos con diabetes mellitus mal controlada, insuficiencia cardíaca crónica o hepática descompensada. Ninguno tenía una enfermedad infecciosa concurrente que pudiese entorpecer el tratamiento. En la tabla 1 se resumen las características generales de los pacientes.

## Obtención de las células mononucleares de la médula ósea

La obtención de la médula ósea del propio paciente para la extracción de las CMN-MO se hizo en el salón de operaciones, previa anestesia general endovenosa. Se realizó mediante la aspiración de médula ósea de la cresta iliaca posterior; y se colectó en bolsas plásticas que contenían CPD-adenina, como anticoagulante. Las células se aislaron mediante un gradiente de densidad con Ficoll - Hypaque, según el proceder estandarizado que se emplea en el Instituto de Hematología e Inmunología.(39) Finalmente las células fueron resuspendidas en solución salina para su inyección.

## Recuento e identificación de células mononucleares de la médula ósea

Al concentrado se le realizó el recuento de CMN-MO mediante conteo en un contador automático de células MINDRAY BC-3200 (Bio-Medical Electronics Co. Ltd, Shenzhen, China). El recuento diferencial se realizó además en extensiones del CMN-MO en láminas de cristal teñidas con May - Grunwald - Giemsa. Para la determinación de la viabilidad se empleó el método del Tripán azul. En una submuestra (n=10) se realizó la caracterización inmunofenotípica del concentrado CMN-MO. Para ello se cuantificó la expresión de las moléculas CD34, CD45, CD117, HLADR, CD29 y CD14, mediante inmunofluorescencia directa por citometría de flujo utilizando simple y doble marcaje en un citómetro FaCScan (Benton Dickinson, EE UU).

## Implantación de las células mononucleares de la médula ósea en la cadera afectada

El implante se llevó a cabo en el salón de operaciones, bajo anestesia general endovenosa en mesa ortopédica y controlada con un intensificador de imágenes. Se realizó una incisión lateral de unos 5 cm de longitud, distal al trocante mayor; se localizó el hueso y a unos 2 cm por debajo de la fosa trocantérica del trocante mayor se inició la perforación con un trépano de 4.5 mm de diámetro, que se pasó a través del cuello y la cabeza femoral hasta la zona necrótica hasta 2-3 mm de la superficie articular. Se implantaron las células a través del orificio en la zona necrótica mediante un trocar de biopsia ósea. Posteriormente se suturó por planos.

## Seguimiento evolutivo

En el post-operatorio fueron egresados entre las 48 horas y siete días. Se restringió el apoyo del miembro operado por ocho semanas. Todos los pacientes fueron seguidos por un mínimo de dos años en consulta externa, siendo evaluados por la escala de la Clínica de los Hermanos Mayo.(40) Esta escala de medición de los resultados tiene un máximo de 80 puntos y está basada en especial en el síntoma dolor, ya que es la principal causa que lleva al paciente al acto operatorio. La asignación de puntos se describe a continuación:

**Evaluación de la intensidad del dolor** (10 a 40 puntos): 10 intenso, 20 moderado, 30 ocasional y 40 ausencia de dolor.

**Evaluación a la función** (0 a 20 puntos): Incluye distancia de marcha; 15 puntos (0 no camina, 2 en la casa, 7 hasta 300 metros, 12 hasta 600 metros y 15 hasta 1000 metros) y uso de bastones; 5 puntos (3 permanente, 4 ocasional y 5 ninguno).

**Evaluación de la movilidad y poder muscular** (0 a 20 puntos): de 3 a 5 para capacidad de introducirse en un automóvil (3 con dificultad y 5 fácilmente); de 3 a 5 para cuidado de sus pies (3 con dificultad y 5 fácilmente); de 0 a 5 claudicación (0 severa, 3 moderada y 5 no presenta); de 0 a 5 para subir escaleras (0 no puede, 2 escalón a escalón, 4 sosteniéndose y 5 normal).

La respuesta se midió por la suma de los valores dados a estos parámetros clínicos y se consideró: malo por debajo de 49 puntos; regular entre 50 y 59; bueno entre 60 y 69 y excelente entre 70 y 80 puntos.

La valoración radiográfica fue realizada por los expertos comparando las imágenes, antes y después del implante, donde solo se evaluaba la evolución del área necrótica. La misma podía desaparecer, disminuir, mantenerse o aumentar el área.

## Análisis estadístico

El tratamiento de los datos se realizó mediante el programa estadístico SPSS versión 15.0 para Windows, previa confección de una base de datos donde se introdujo la información obtenida. Como medida de resumen para los datos cuantitativos se utilizaron la media y la desviación estándar y para los cualitativos las frecuencias absolutas y los porcentajes.

Se realizó la comparación del promedio de los valores de las variables cuantitativas antes del tratamiento y a los 6, 12 y 24 meses, mediante la prueba de Friedman, considerando un nivel de significación de  $p \leq 0,05$ . En caso de que las comparaciones múltiples resultaran estadísticamente significativas, para analizar cuáles grupos diferían entre sí, se utilizó la prueba de Wilcoxon para dos muestras relacionadas, acompañada de la corrección de Bonferroni para controlar la probabilidad de cometer errores de tipo I. La aplicación de esta corrección al hacer comparaciones por pares llevó a basar las decisiones en un nivel de significación de  $0,05/6=0,008$ . Es decir, se consideró que los promedios de dos variables diferían significativamente cuando el nivel crítico obtenido fuera menor que 0,008.

## Aspectos éticos

Esta investigación se realizó de acuerdo a los principios establecidos en la Declaración de Helsinki (41) para la investigación con seres humanos y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada paciente o su representante legal, así como la aprobación de los consejos científicos y de ética de la investigación del Instituto de Hematología e Inmunología.

## Resultados

No se presentaron efectos adversos con la extracción de la MO, aunque un paciente presentó un síndrome torácico agudo en las primeras 48 horas de implantado, que evolucionó favorable-

mente con el tratamiento aplicado. No hubo infección en el sitio de extracción, ni en la herida quirúrgica.

El promedio del volumen total de extracción fue de 94,6 mL. El promedio del volumen final del concentrado fue de 9,2 mL con un rango entre 6 y 12 mL. En ese volumen el conteo de células mononucleares tuvo una media de  $546,6 \times 10^9$  con un rango de ( $60$  a  $1\,208 \times 10^9$ ). La viabilidad celular osciló entre 89 a 99 %, con un promedio de 97 %.

En la caracterización fenotípica del concentrado se observó una mayor expresión de las moléculas específicas de membrana que corresponden con el patrón de expresión de las poblaciones de células madre adherentes del estroma medular CD34-/CD45-/DR-/CD29+/CD14-/CD117- comparadas con el fenotipo de moléculas de membrana descrito para la célula madre hematopoyética CD34+/CD45-/CD117+/DR+ (tabla 2). Esto demuestra la presencia de células mesenquimales, hematopoyéticas y endoteliales en el concentrado implantado.

La escala de la Clínica de los hermanos Mayo se aplicó a los 18 pacientes. Una paciente falleció por un tromboembolismo pulmonar a los siete meses de tratada, cuando se encontraba en rehabilitación, este evento no estuvo asociado al implante de CMN-MO. Se observó mejoría en todos los parámetros evaluados por esta escala. En la tabla 3 se reflejan la media y la desviación estándar de las diferentes variables en cada una de las etapas evaluadas. La disminución de la intensidad del dolor fue evidente desde la primera semana del tratamiento en el 100% de los pacientes. En general, las comparaciones de todas las variables de tratamiento fueron significativas ( $p=0,000$ ). En las pruebas *a posteriori* todas las comparaciones fueron significativas, excepto la de 12 meses vs 24 meses (tabla 3).

En cuanto a la evaluación de la respuesta final, la media de los resultados fue de 72,9 puntos y se informaron 12 pacientes por encima de dicha cifra.

En la evaluación radiográfica se evidenció resolución completa del área necrótica en siete caderas (41,2 %) y disminución en tres caderas (17,6 %). Mientras que en cuatro caderas (23,5 %) no hubo variación radiológica y en otras tres caderas (17,6 %) se evidenció un aumento del área necrótica. En la figura se muestra uno de los pacientes con evolución satisfactoria. El remplazo total de cadera fue necesario en tres pacientes (17,6 %), de ellas uno en estadio II y dos en estadio III, según la clasificación empleada.

Los mejores resultados clínicos y radiográficos se observaron en aquellos pacientes que se encontraron en los estadios iniciales (I o II) de la enfermedad.

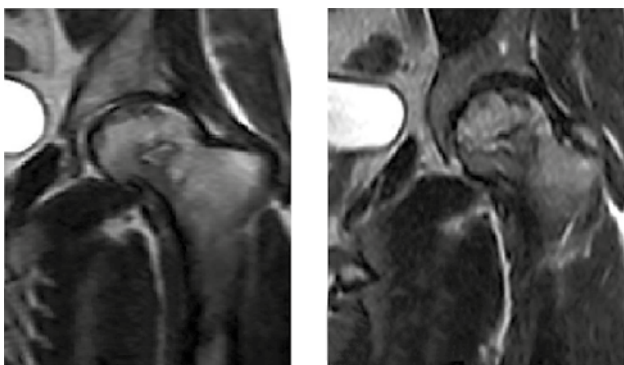
## Discusión

Con el implante de CMN-MO se observó mejoría significativa ( $p=0,000$ ) de los signos y síntomas causados por la NACF que se mantuvo por un periodo mayor a dos años. Es de destacar que se alcanza una mejoría clínica a partir de los 6 meses de implantado siendo máxima a los 12 meses y que se mantiene a los 24 meses en la mayoría de los pacientes según se muestra en la tabla 3.

Algunos estudios han indicado que en la evolución de la NACF y específicamente la destrucción de la cabeza femoral puede influir el tamaño de la lesión, localización, estadio y causa de la NACF.(1, 5, 11) En este estudio el 82 % tuvo una evolución favorable independientemente de las variables antes expuestas, por lo que podemos sugerir que esta terapia es efectiva en pacientes con drepanocitosis. Varios autores plantean que la descompresión es un tratamiento aceptable para la lesión grado I de Ficat pero que deben ser utilizados métodos alternativos de tratamiento para los estadios II y III porque para estos los resultados no son favorables.(42, 43) Nuestros resultados sugieren que el implante de CMN-MO más que una alternativa es un complemento viable para el tratamiento de la NACF en pacientes con drepanocitosis

porque incluso en el 50% de los pacientes con lesión grado III se logró posponer el reemplazo protésico por más de dos años, por lo que este invasivo proceder sólo estaría indicado en grados avanzados de necrosis. No obstante, mientras más incipiente sea el grado de lesión mejor serán los resultados.

Se conoce que existe una disminución del número de células mesenquimales en el tercio proximal del fémur en los pacientes con NACF.(24, 25) Esta insuficiencia de células osteogénicas podría explicar un inadecuado mecanismo de reparación ósea, que conduce al colapso de la cabeza femoral. Cuando se realiza el implante de este concentrado celular obtenido de la médula ósea aumenta el número de células y se favorece o potencia este mecanismo. Se ha comprobado que las células madre hematopoyéticas pueden producir varios elementos solubles que son esenciales para su acción y que incluyen factores que intervienen en la citoprotección, proliferación, diferenciación y migración celular, angiogénesis, respuesta inflamatoria, asentamiento celular, entre otras.(44) Estudios recientes evidencian la existencia de diferentes poblaciones de células madre no hematopoyéticas en la médula ósea y que incluyen: células madre mesenquimales (CMM); células progenitoras multipotentes adultas (MAPCs, del inglés progenitor *multipotent stem cells*); células inducibles de multilínea adultas aisladas de médula ósea (MIAMI, del inglés *marrow isolated adult multilineage inducible*); células madre multipotentes adultas (MASCs, del inglés, *multipotent adult stem cells*); células progenitoras endoteliales (CPE); omnicitos y células madre pequeñas parecidas a células embrionarias, conocidas como VSELs (del inglés, *very small embryonic like*) que han sido identificadas y caracterizadas como una población de células adherentes derivadas de la médula ósea capaces de diferenciarse a múltiples líneas mesodérmicas.(45,46) Ellas tienen la capacidad de diferenciarse hacia osteoblastos, condrocitos, adipocitos o incluso músculo esquelético según las condiciones en las que se cultivan lo que contribuyen a la osteogénesis y angiogénesis, a esto se debe la efectividad de las CMN-MO.(47) favoreciendo el proceso de remodelación ósea; principalmente en las etapas más tempranas de la NACF. Aunque la muestra es pequeña podemos avalar el efecto terapéutico del implante de CMN-MO en la NACF en pacientes con drepanocitosis. El mismo tiene una repercusión notable sobre la calidad de vida del enfermo ya que permite su incorporación a la actividad diaria y evita su invalidez. Este proceder tiene como ventajas que es sencillo, fácil y económico para centros con recursos limitados, lo que facilita su extensión sobre todo en regiones con una alta incidencia de pacientes con drepanocitosis. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores.(7,26,48) Aunque hay relativamente pocas investigaciones clínicas en este campo; algunas de ellas pequeños ensayos no controlados, han evidenciado los efectos beneficiosos de la implantación de CMN-MO en la NACF.



**Fig.** Paciente masculino de 46 años de edad, SC. A) Preimplante. B) 1 año después de implantado.

**Tabla 1.** Características basales de la muestra. n=18

Edad	Media	Rango
Edad (años)	32,8	21-46
Sexo	N	%
Femenino	10	55,56
Masculino	8	44,44
Hemoglobinopatía		
Homocigótico SS	13	72,22
Heterocigótico SC	5	27,78
Lateralidad		
Derecho	7	38,89
Izquierdo	11	61,11
Clasificación de Ficat		
Estadio I	3	16,67
Estadio II	9	50,00
Estadio III	6	33,33
Tiempo de evolución		
Menos de 2 años	4	22,22
Entre 2 y 3 años	5	27,78
Más de 3 años	9	50,00

**Tabla 2.** Expresión fenotípica de marcadores de membrana

Marcador	Simple Marcado N= 6 (%)	Doble Marcado N = 4 (%)
CD34-/CD45-	19,28	20,79
HLA DR	86,30	15,66
CD29+	27,64	36,08
CD14-	91,84	95,89
CD117-	16,83	11,23

## Conclusiones

El implante de CMN-MO para los primeros estadios de la NACF, es un tratamiento útil en los pacientes con drepanocitosis. Se observó mejoría clínica a partir de los seis meses de implantado que se mantenía a los dos años. La mejoría radiológica se observó a partir del primer año de implantado. No se observaron complicaciones por el tratamiento.

El método empleado es relativamente simple, poco costoso lo que permite su extensión a otras instituciones de salud incluyendo las que tengan recursos limitados.

## Agradecimientos

A la Dra. Elvira Dorticós Balea. Especialista de grado en Hematología. Investigador y Profesor Auxiliar. Dr. Alberto Benítez-Herrera. Especialista de 2 grado en Ortopedia y Traumatología. Investigador y Profesor Auxiliar. Lic. Lázara Minerva Tam-Rey. Lic. Laboratorio Clínico.

## Referencias bibliográficas

- Poignard A, Flouzat-Lachaniette CH, Amzallag J, Galacteros F, Hernigou P. The natural progression of symptomatic humeral head osteonecrosis in adults with sickle cell disease. *J Bone Joint Surg Am.* 2012 Jan 18;94(2):156-62. PubMed DOI: 10.2106/jbjs.j.00919.
- Styles LA, Vichinsky EP. Core decompression in avascular necrosis of the hip in sickle-cell disease. *American journal of hematology.* 1996 Jun;52(2):103-7. PubMed DOI: 10.1002/(sici)1096-8652(199606)52:2<103::aid-ajh6>3.0.co;2-y.



**Tabla 3.** Evaluación según la escala de la Clínica de los Hermanos Mayo

Parámetros	(media ± DS)			
	Pre implante	6 meses	12 meses	24 meses
<b>Dolor (10-40)</b>	15,88±5,07	29,41±7,47 p=0.000 <sup>a,b</sup>	35,88±6,18 p=0.000 <sup>a,b</sup> p=0.002 <sup>c</sup>	36,5±6,06 p= 0.000 <sup>a,b</sup> p= 0.003 <sup>d</sup> p= 0.317 <sup>e</sup>
<b>Distancia de marcha</b>	4,8±3,7	9,4±4,0	13,2±2,7	13,8±2,2
<b>Uso de bastón</b>	3,7±0,6	4,5±0,8	4,6±0,7	4,6±0,7
<b>Función (0-20)</b>	8,53±4,15	13,88±4,59 p=0.000 <sup>a,b</sup>	17,76±3,01 p= 0.000 <sup>a,b</sup> p=0.001 <sup>c</sup>	18,41±2,67 p= 0.000 <sup>a,b</sup> p= 0.001 <sup>d</sup> p= 0.180 <sup>e</sup>
<b>Movilización en un auto</b>	3,0 ±0,0	3,2±1,0	4,3±0,8	4,3±0,8
<b>Cuidado de los pies</b>	3,0 ±0,0	3,2±0,7	4,3±1,0	4,3±1,0
<b>Claudicación</b>	1,8±1,5	3,9±1,0	4,4±0,9	4,4±0,9
<b>Subir escaleras</b>	2,5±1,5	3,9±0,8	4,6±0,5	4,7±0,5
<b>Movilización (0-20)</b>	10,24±2,84	15,12±2,75 p=0.000 <sup>a,b</sup>	18,00±2,80 p= 0.000 <sup>a,b</sup> p=0.001 <sup>c</sup>	18,06±2,83 p= 0.000 <sup>a,b</sup> p= 0.001 <sup>d</sup> p= 0.317 <sup>e</sup>
<b>Respuesta final</b>	34,65±10,13	58,41±12,74 p= 0.000 <sup>a,b</sup>	71,65±11,16 p= 0.000 <sup>a,b</sup> p=0.001 <sup>c</sup>	72,94±11,17 p= 0.000 <sup>a,b</sup> p= 0.001 <sup>d</sup> p= 0.109 <sup>e</sup>

<sup>a</sup>Valores de p vs preimplante (p<0.05).

<sup>b</sup>Valores de p vs preimplante (corrección de Bonferroni 0.05/6=0.008)(p<0.008).

<sup>c</sup>Valores de p de 12 meses vs 6 meses (corrección de Bonferroni 0.05/6=0.008)(p<0.008).

<sup>d</sup>Valores de p de 24 meses vs 6 meses (corrección de Bonferroni 0.05/6=0.008)(p<0.008).

<sup>e</sup>Valores de p de 24 meses vs 12 meses (corrección de Bonferroni 0.05/6=0.008)(p<0.008).

- Hernigou P. Avascular necrosis of head of femur. *Indian J Orthop.* 2009 Jan;43(1):1-2. PubMed DOI: 10.4103/0019-5413.45316 [doi].
- Sorich MM, Cherian JJ, McElroy MJ, Banerjee S, Jones LC, Minniti CP, et al. Osteonecrosis of the Hip in Hematologic Disease: A Review of Conditions and Treatment Options. *Journal of long-term effects of medical implants.* 2015;25(4):253-68. PubMed.
- Martí-Carvajal AJ, Solà I, Agreda-Pérez LH. Treatment for avascular necrosis of bone in people with sickle cell disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2014;10.1002/14651858.CD004344.pub5(7). PubMed DOI: 10.1002/14651858.CD004344.pub5.
- Mukisi-Mukaza M, Manicom O, Alexis C, Bashoun K, Donkerwolcke M, Burny F. Treatment of sickle cell disease's hip necrosis by core decompression: a prospective case-control study. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2009 Nov;95(7):498-504. PubMed DOI: 10.1016/j.otsr.2009.07.009.
- Kamath AF, McGraw MH, Israelite CL. Surgical management of osteonecrosis of the femoral head in patients with sickle cell disease. *World journal of orthopedics.* 2015 Nov 18;6(10):776-82. PubMed DOI: 10.5312/wjo.v6.i10.776.
- Banerjee S, Issa K, Pivec R, Kapadia BH, Khanuja HS, Mont MA. Osteonecrosis of the hip: treatment options and outcomes. *Orthop Clin North Am.* 2013 Oct;44(4):463-76. PubMed DOI: 10.1016/j.ocl.2013.07.004.
- Pivec R, Johnson AJ, Harwin SF, Mont MA. Differentiation, diagnosis, and treatment of osteoarthritis, osteonecrosis, and rapidly progressive osteoarthritis. *Orthopedics.* 2013 Feb;36(2):118-25. PubMed DOI: 10.3928/01477447-20130122-04.
- Hernigou P, Flouzat-Lachaniette CH, Roussignol X, Poignard A. The natural progression of shoulder osteonecrosis related to corticosteroid treatment. *Clin Orthop Relat Res.* 2010 Jul;468(7):1809-16. PubMed DOI: 10.1007/s11999-009-1094-1.
- Hernigou P, Habibi A, Bachir D, Galacteros F. The natural history of asymptomatic osteonecrosis of the femoral head in adults with sickle cell disease. *J Bone Joint Surg Am.* 2006 Dec;88(12):2565-72. PubMed DOI: 10.2106/jbjs.e.01455.
- Flouzat-Lachaniette CH, Roussignol X, Poignard A, Mukasa MM, Manicom O, Hernigou P. Multifocal joint osteonecrosis in sickle cell disease. *Open Orthop J.* 2009;3:32-5. PubMed DOI: 10.2174/1874325000903010032 [doi].
- Mukisi Mukaza M, Manicom O, Alexis C, Bashoun K, Donkerwolcke M, Burny F. Sickle cell disease's hip necrosis: The core decompression treatment option. 2009 Nov;95(7):601-8. PubMed DOI: 10.1016/j.rcot.2009.09.005.
- Shah SN, Kapoor CS, Jhaveri MR, Golwala PP, Patel S. Analysis of outcome of avascular necrosis of femoral head treated by core decompression and bone grafting. *Journal of clinical orthopaedics and trauma.* 2015 Sep;6(3):160-6. PubMed DOI: 10.1016/j.jcot.2015.03.008.
- Liu D, Chen Q, Chen Y, Liu Y. Long-term follow-up of early-middle stage avascular necrosis of femoral head with core decompression and bone grafting. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2012 Oct;26(10):1165-8. PubMed.
- Hernigou P, Caton J. Design, operative technique and ten-year results of the Hermes patellofemoral arthroplasty. *Int Orthop.* 2014 Feb;38(2):437-42. PubMed DOI: 10.1007/s00264-013-2158-0.



17. Shao Y, Zhang C, Charron KD, Macdonald SJ, McCalden RW, Bourne RB. The Fate of the Remaining Knee(s) or Hip(s) in Osteoarthritic Patients Undergoing a Primary TKA or THA. *J Arthroplasty*. 2013 Dec;28(10):1842-5. PubMed DOI: S0883-5403(13)00067-3 [pii]10.1016/j.arth.2012.10.008.
18. Hernigou P, Roussignol X, Delambre J, Poignard A, Flouzat-Lachaniette CH. Ceramic-on-ceramic THA associated with fewer dislocations and less muscle degeneration by preserving muscle progenitors. *Clin Orthop Relat Res*. 2015 Dec;473(12):3762-9. PubMed DOI: 10.1007/s11999-015-4378-7.
19. Bellot F, Havet E, Gabrion A, Meunier W, Mertl P, de Lestang M. Core decompression of the femoral head for avascular necrosis. *Revue de chirurgie orthopedique et reparatrice de l'appareil moteur*. 2005 Apr;91(2):114-23. PubMed.
20. Arlet J, Ficat P. Forage-biopsie de la tête fémorale dans l'ostéonécrose primitive. Observations histo-pathologiques portant sur huit forages. *Rev Rhumat*. 1964;31:257-64. PubMed.
21. Ficat RP. Idiopathic bone necrosis of the femoral head. Early diagnosis and treatment. *J Bone Joint Surg Br*. 1985 Jan;67(1):3-9. PubMed.
22. Smith SW, Fehring TK, Griffin WL, Beaver WB. Core decompression of the osteonecrotic femoral head. *J Bone Joint Surg Am*. 1995 May;77(5):674-80. PubMed.
23. Aigner N, Schneider W, Eberl V, Knahr K. Core decompression in early stages of femoral head osteonecrosis--an MRI-controlled study. *Int Orthop*. 2002;26(1):31-5. PubMed.
24. Feng Y, Yang SH, Xiao BJ, Xu WH, Ye SN, Xia T, et al. Decreased in the number and function of circulation endothelial progenitor cells in patients with avascular necrosis of the femoral head. *Bone*. 2009 Jan;46(1):32-40. PubMed DOI: S8756-3282(09)01890-0 [pii]
25. Hernigou P, Beaujean F, Lambotte JC. Decrease in the mesenchymal stem-cell pool in the proximal femur in corticosteroid-induced osteonecrosis. *J Bone Joint Surg Br*. 1999 Mar;81(2):349-55. PubMed.
26. Rackwitz L, Eden L, Reppenhagen S, Reichert JC, Jakob F, Walles H, et al. Stem cell- and growth factor-based regenerative therapies for avascular necrosis of the femoral head. *Stem Cell Res Ther*. 2012;3(1):7. PubMed DOI: scrt98 [pii]10.1186/scrt98.
27. Hernigou P. Bone transplantation and tissue engineering, part III: allografts, bone grafting and bone banking in the twentieth century. *Int Orthop*. 2015 Mar;39(3):577-87. PubMed DOI: 10.1007/s00264-015-2669-y.
28. Ziadlou R, Shalhoseini M, Safari F, Sayahpour FA, Nemati S, Es-laminejad MB. Comparative analysis of neural differentiation potential in human mesenchymal stem cells derived from chorion and adult bone marrow. *Cell Tissue Res*. 2015 Nov;362(2):367-77. PubMed DOI: 10.1007/s00441-015-2210-z.
29. Bura A, Planat-Benard V, Bourin P, Silvestre J, Gross F. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy*. 2014;16:245 - 57. PubMed.
30. Nakashima T, Liu T, Yu H, Ding L, Ullrich M, Hu B, et al. Lung bone marrow-derived hematopoietic progenitor cells enhance pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013 Oct 15;188(8):976-84. PubMed DOI: 10.1164/rccm.201303-0479OC.
31. Andrade BM, Baldanza MR, Ribeiro KC, Porto A, Pecanha R, Fortes FS, et al. Bone marrow mesenchymal cells improve muscle function in a skeletal muscle re-injury model. *PLoS One*. 2015;10(6):e0127561. PubMed DOI: 10.1371/journal.pone.0127561.
32. Sanina C, Hare JM. Mesenchymal Stem Cells as a Biological Drug for Heart Disease: Where Are We With Cardiac Cell-Based Therapy? *Circulation research*. 2015 Jul 17;117(3):229-33. PubMed DOI: 10.1161/circresaha.117.306306.
33. Hernández Ramírez P, Dorticós Balea E. Medicina regenerativa: Células madre embrionarias y adultas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2004;20:0-. PubMed.
34. Rasini V, Dominici M, Kluba T, Siegel G, Lusenti G, Northoff H, et al. Mesenchymal stromal/stem cells markers in the human bone marrow. *Cytotherapy*. 2013 Mar;15(3):292-306. PubMed DOI: 10.1016/j.jcyt.2012.11.009.
35. Neckar P, Sykova E. Stem cells in orthopaedics. *Casopis lekaru ceskych*. 2015;154(3):107-9. PubMed.
36. Hernández RP, Forrellat BM. Ventajas de la terapia celular con células mononucleares derivadas de la médula ósea, aplicadas en su conjunto. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2013;29(4):407-12. PubMed.
37. Hernández P, Cortina L, Artaza H, Pol N, Lam RM, Dorticós E, et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation in patients with severe lower limb ischaemia: A comparison of using blood cell separator and Ficoll density gradient centrifugation. *Atherosclerosis* 2007;194:52-6. PubMed.
38. Mizuno H, Miyamoto M, Shimamoto M, Koike S, Hyakusoku H, Kuroyanagi Y. Therapeutic angiogenesis by autologous bone marrow cell implantation together with allogeneic cultured dermal substitute for intractable ulcers in critical limb ischaemia. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010 Nov;63(11):1875-82. PubMed DOI: 10.1016/j.bjps.2009.11.037.
39. Cortina Rosales L, Hernández Ramírez P, López De Roux MR, Artaza Sanz HM, Dorticós Balea E, Macías Abraham C, et al. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica para trasplante de células madre: Método simplificado. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2008;24:0-. PubMed.
40. Kavanagh BF, Ilstrup DM, Fitzgerald RH. Revision total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 1985;67(4):517-26. PubMed.
41. Association WM. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2013;10.1001/jama.2013.281053. PubMed DOI: 10.1001/jama.2013.281053.
42. Aigner N, Petje G, Schneider W, Meizer R, Wlk M, Kotsaris S, et al. Bone marrow edema syndrome of the femoral head: treatment with the prostacyclin analogue iloprost vs. core decompression: an MRI-controlled study. *Wien Klin Wochenschr*. 2005 Feb;117(4):130-5. PubMed.
43. Flouzat-Lachaniette CH, Roubineau F, Heyberger C, Bouthors C, Hernigou P. Multifocal osteonecrosis related to corticosteroid: ten years later, risk of progression and observation of subsequent new osteonecroses. *Int Orthop*. 2016 Apr;40(4):669-72. PubMed DOI: 10.1007/s00264-015-3060-8.
44. Fidelis-de-Oliveira P, Werneck-de-Castro JP, Pinho-Ribeiro V, Shalom BC, Nascimento-Silva JH, Costa e Souza RH, et al. Soluble factors from multipotent mesenchymal stromal cells have antinecrotic effect on cardiomyocytes in vitro and improve cardiac function in infarcted rat hearts. *Cell Transplant*. 2012;21(5):1011-21. PubMed DOI: 10.3727/096368911x623916.
45. Macías-Abraham C, Valle-Pérez LO, Baganet -Cobas A, Dorticós- Balea E, Jaime-Fagundo JC, Lam -Díaz RM. Caracterización fenotípica de las células madre de médula ósea utilizadas en la terapia celular regenerativa. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2011;27(2):233-43. PubMed.
46. Niemeyer P, Kornacker M, Mehlhorn A, Seckinger A, Vohrer J, Schmal H. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Tissue Eng*. 2007;13:111 - 21. PubMed.
47. Pak J, Lee J, Lee S. Regenerative repair of damaged meniscus with autologous adipose tissue-derived stem cells. *Biomed Res Int*. 2014;2014:436029. PubMed.
48. Xu M, Peng D. Mesenchymal stem cells cultured on tantalum used in early-stage avascular necrosis of the femoral head. *Med Hypotheses*. 2010 Feb;76(2):199-200. PubMed DOI: S0306-9877(10)00394-4 [pii]10.1016/j.mehy.2010.09.028

## ARTÍCULO DE REVISIÓN

## Importancia de los lipopéptidos de *Bacillus subtilis* en el control biológico de enfermedades en cultivos de gran valor económico

### Importance of *Bacillus subtilis* lipopeptides in the biological control of diseases in crops of high economic value

Franklin Eduardo Sánchez Pila

Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay, Ecuador.

## RESUMEN

Se determinaron los avances en el control biológico de enfermedades en cultivos de importancia económica, en donde *Bacillus subtilis* tiene un rol preponderante, puesto que sus lipopéptidos demuestran su efectividad al momento de controlar un rango muy amplio de enfermedades que atacan a los cultivos de mayor importancia en nuestro país y en el mundo. En los tres cultivos analizados se dan detalles de la efectividad de *Bacillus subtilis* para el control de las enfermedades más devastadoras. En *Magnaporthe oryzae* se determina que la severidad puede ser detenida con gran efectividad, por lo que será necesario ampliar la experimentación hacia la protección de la semilla del arroz. Para *Rhizoctonia solani* los resultados exhibidos son muy alentadores. Esta enfermedad es de mucha importancia no solo en el cultivo de papas, sino que en toda la variedad de solanáceas y leguminosas cultivadas principalmente en el callejón interandino. En tanto que para *Mycosphaerella fijiensis* se detallan excelentes resultados ante un patógeno extremadamente agresivo y que su control trae grandes impactos en la población y en el ambiente. Ante lo manifestado el *Bacillus subtilis* se perfila como uno de los principales agentes biocontroladores para lograr un correcto manejo fitosanitario de los cultivos de mayor importancia en nuestro medio.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, Surfactinas, Iturrinas, Fengicinas, arroz, solanáceas, banano.

## ABSTRACT

Advances in the biological control of diseases in economically important crops, where *Bacillus subtilis* has a preponderant role were determined, since their lipopeptides demonstrate its effectiveness when controlling a wide range of diseases that attack crops of major importance in our country and the world. In the three crops tested details *Bacillus subtilis* effectiveness for control of the most devastating diseases are given. In *Magnaporthe oryzae* it is determined that the severity can be stopped very effectively, so experimentation will be necessary to extend the protection of seed rice. For *Rhizoctonia solani* displayed results are very encouraging. This disease is very important not only in the cultivation of potatoes, but in every variety of Solanaceae and legumes grown mainly in the inter-Andean alley. While for *Mycosphaerella fijiensis* excellent results are detailed to an extremely aggressive pathogen and its control brings great impacts on the population and the environment. Given what was said *Bacillus subtilis* is emerging as a major biocontrol agents for proper phytosanitary management of crops of major importance in our environment.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, surfactin, Iturrinas, Fengicinas, rice, Solanaceae, bananas.

### Introducción

El uso indiscriminado de agroquímicos para el control de enfermedades de las plantas cultivadas ha perturbado el balance ecológico de los microorganismos del suelo, conduciendo al desarrollo de cepas de patógenos resistentes, contaminación de aguas freáticas y obviamente riesgos a la salud de los humanos [1].

En el contexto del control biológico de enfermedades de los cultivos, las tres familias de lipopéptidos de *Bacillus*, Surfactina, Iturrinas y Fengicinas han sido estudiadas por sus potenciales actividades antagónicas contra varios fitopatógenos [1].

Las surfactinas es la familia más estudiada de los lipopéptidos [2], tiene la habilidad de inducir resistencia sistémica en plantas y la propiedad para proliferar

células bacterianas, facilitando así la colonización de la rizósfera [1]. Con esta característica, este lipopéptido en condiciones *in situ*, expresa acción protectora y un biocontrol eficiente en *Arabidopsis* frente a *Pseudomonas syringae*, debido a la formación de un biofilm antimicrobiano que permite la colonización de las superficies de las raíces para la secreción de un antibiótico, la surfactina [3].

La familia de las iturrinas representada por la iturrina A, micosubtilinas y baciliomicinas, muestran una fuerte actividad antifúngica [2]. La iturrina A purificada suprime el crecimiento de varios tipos de hongos incluyendo *Rhizoctonia solani* en ensayos con placas [5]. Aunque las surfactinas tienen una actividad antibiótica relativamente débil, la actividad antibiótica de la iturrina A es muy fuerte [6].

<sup>1</sup>Licenciado en Bioquímica. Máster en Biotecnología Mención Investigación de nuevos productos. Quito, Ecuador.

**Correspondencia:** Alexey Llopiz. E mail: alexey-llopiz@outlook.com.

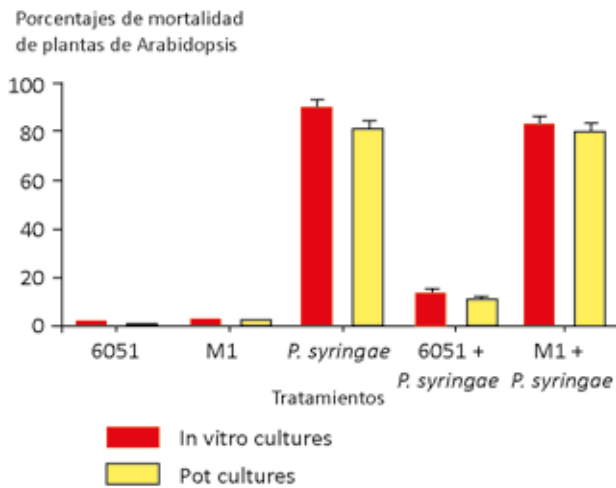


Fig. 1. Resultados del porcentaje de mortalidad de las plantas de *Arabidopsis* antes los diferentes tratamientos.

Las fengicinas son un lipopéptido bioactivo producido por algunas cepas de *Bacillus subtilis*, que demuestra actividad antifúngica contra los filamentos de los hongos. Como la mayoría de péptidos naturales antimicrobianos, las fengicinas probablemente actúan haciendo la membrana plasmática de la célula objetivo más permeable [7].

Los lipopéptidos son conocidos por actuar de manera sinérgica, algunos estudios sugieren surfactinas con iturrinas [8], surfactinas con fengicinas [9] y fengicinas con iturrinas [10].

### Modo de acción

#### • Colonización de la rizósfera

Las raíces de las plantas exudan un enorme rango de compuestos de bajo peso molecular potencialmente valiosos dentro de la rizósfera. Algunas de las experiencias de interacciones químicas, físicas y biológicas en plantas terrestres son aquellas que ocurren entre las raíces y su ambiente circundante en el suelo [11].

Bais [3] reporta que parte del mecanismo de biocontrol de *Bacillus subtilis* 6051 se adhiere a la superficie de las raíces de *Arabidopsis*. Después de cuatro días en medios Murashige y Skoog para crecimiento conjunto de *Arabidopsis* y *Bacillus subtilis* 6051, utilizando microscopio de barrido láser, se observa que las células de *Bacillus subtilis* 6051 han colonizado toda la superficie de la raíz de *Arabidopsis*. En parte del mismo estudio, la *Arabidopsis* cultivada en suelo estéril con *Bacillus subtilis* 6051 forma una biopelícula estable y no patogénica.

### Antagonismo

Una vez establecido en la rizósfera, los aislados de *Bacillus* pueden desplegar todo su arsenal de antibióticos [1]. La Iturina A muestra una fuerte actividad antibiótica con un amplio espectro antifúngico, haciéndola un agente ideal para el control biológico con el objetivo de reducir el uso de pesticidas en la agricultura. Este efecto se demuestra cuando en una suspensión de esporas de *P. crustosum*, estas se hinchan y los lados crecen. Esto es debido al desequilibrio osmótico causado por los antibióticos [12]. Igualmente Marrone informa que los lipopéptidos extraídos de *Bacillus subtilis* UMAF6639, el cual produce iturina A, fengicina y surfactina inhiben la germinación de las esporas. [13]

La producción de iturina A es frecuentemente un factor muy importante con respecto a la actividad antimicótica. Ensayos de inhibición in vitro contra siete diferentes patógenos de poscosecha en cítricos, aguacates y mangos, probaron el rango de la capacidad antagonista de iturina A de *Bacillus amyloliquefaciens*. Todos los patógenos fueron afectados sin excepción, en comparación con otros dos lipopéptidos, fengicinas y surfactinas que no tuvieron mayor efecto en todos los patógenos [12].

La iturina A trastorna la membrana citoplasmática del hongo, creando canales a través de la membrana, lo cual permite la liberación de iones vitales como el  $K^+$  [14].

### Inducción a la resistencia

Las fengicinas y las surfactinas pueden interactuar con las células de las plantas como factor determinante para la activación de una respuesta inmunitaria a través de la estimulación del fenómeno de inducción al sistema de resistencia [1].

Junto con el antagonismo directo, algunas bacterias benéficas pueden proteger las plantas indirectamente, a través de la estimulación del mecanismo inducible, que hace al hospedero más resistente al futuro ingreso de patógenos. Esa inducción, de la capacidad defensiva mejorada puede ser sistémica, como se mostró con los tratamientos de raíces con bacterias para provocar la protección de la parte aérea y de raíces de las plantas. Este fenómeno es conocido como "resistencia sistémica inducida" RSI [15].

Las fengicinas muestran una fuerte actividad antifúngica y, por lo tanto, puede desempeñar un doble rol para la reducción de las enfermedades de las plantas. Estos compuestos pueden actuar mejorando la capacidad defensiva del hospedero, pero también a través del antagonismo microbiano directo [15]. Las surfactinas no son fungotóxicas, pero tienen fuertes propiedades hemolíticas, antibacteriales, antivirales and antitumorales X. Mucha de su actividad biológica puede estar relacionada a su efecto sobre la parte lipídica de las membranas. De su estructura tipo detergente, estas moléculas pueden fácilmente asociarse y anclarse firmemente dentro de las capas de lípidos, creando algún disturbio o perforaciones en el plasma de la membrana que puede activar un torrente de eventos moleculares derivando en respuestas defensivas. Las fengicinas también pueden fácilmente interactuar con las capas de lípidos e igualmente pueden alterar la estructura de las membranas y permeabilizarla [15].

### Utilización de *Bacillus subtilis* en cultivos de importancia económica

#### Arroz

El arroz (*Oryza sativa*) es uno de los cultivos más importantes en la alimentación, el cual provee el 23 % de las calorías consumidas alrededor del mundo [16]. El consumo per capita de arroz en Ecuador es de 54 kilogramos. El tizón del arroz es la enfermedad más destructiva del cultivo, causada por *Magnaporthe oryzae*, cada año esta enfermedad causa pérdidas entre el 10 al 30 % del arroz cultivado [17].

La habilidad del tizón del arroz de mutar en nuevas razas, es la causa del limitado éxito en el control a través de la inducción a la resistencia [18]. En un ensayo donde se utilizaron hojas de arroz tratadas con y sin *Bacillus subtilis* en presencia del patógeno fueron incubadas de 5 a 10 días, las hojas tratadas no mostraron síntomas visibles del tizón permaneciendo verdes y saludables. Estas mostraron que desarrollaron protección en contra de *Magnaporthe oryzae*. Las hojas que no fueron tratadas con *Bacillus subtilis* y que fueron infestadas con el patógeno mostraron desarrollo de la enfermedad [19].

Las dosis utilizadas en el ensayo demuestran que es un factor determinante para el control del patógeno los tratamientos C, D, E presentan diferencias muy significativas, con respecto de A y B. Por lo que se deduce que la utilización de *Bacillus subtilis* controla de manera eficaz, según la dosis aplicada la proliferación de *Magnaporthe oryzae*.

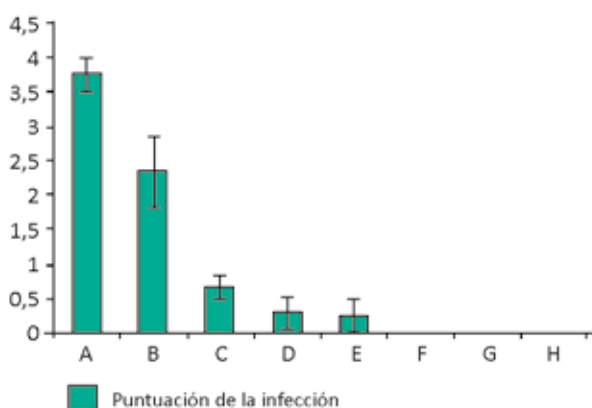
#### Solanáceas

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el tercer cultivo para alimentación más importante del mundo después del trigo y el arroz (<http://www.fao.org/potato-2008/en/potato/pdf.html>). La producción de papas es amenazada por muchas enfermedades, incluido el tizón temprano causado por *Rhizoctonia solani* que es

una de las mayores enfermedades de la papa alrededor del mundo [19]. Los síntomas son los siguientes [20]

- **Hojas:** manchas necróticas en las hojas de color marrón claro a oscuro con anillos concéntricos, manchas restringidas por las nervaduras.
- **Tallos:** manchas necróticas.
- **Tubérculos:** manchas circulares o irregulares de color marrón oscuro, ligeramente hundidas.

Aunque algunos fungicidas químicos han probado su efectividad para el control de *Rhizoctonia solani* estos son útiles en producción orgánica, por lo que el uso de agentes biológicos parece ser una buena alternativa para proteger los cultivos. Recientemente, bacterias y agentes fúngicos han sido descritos para el control de *Rhizoctonia solani*. [21]. En este contexto, *Bacillus subtilis* ha sido ampliamente estudiado como potencial agente biológico contra varias enfermedades de cultivos, debido a su habilidad de producir ciertos antibióticos, lipoproteínas y enzimas hidrolíticas [22].



**Fig. 2.** Resultados del ensayo para determinar la efectividad de *Bacillus subtilis* para contrarrestar *Magnaporthe ryzae*. Se detallan los tratamientos [19].

- A. Hojas inoculadas *Magnaporthe ryzae*.
- B. Hojas tratadas con *Bacillus subtilis* (0,5 ml/mL) + inoculadas *Magnaporthe ryzae*.
- C. Hojas tratadas con *Bacillus subtilis* (1,0 ml/mL) + inoculadas *Magnaporthe ryzae*.
- D. Hojas tratadas con *Bacillus subtilis* (2,0 ml/mL) + inoculadas *Magnaporthe ryzae*.
- E. Hojas tratadas con *Bacillus subtilis* (0,5 ml/mL).
- F. Hojas tratadas con *Bacillus subtilis* (1,0 ml/mL).
- G. Hojas tratadas con *Bacillus subtilis* (2,0 ml/mL).
- H. Control.

La habilidad de *Bacillus subtilis* V26 para el control de *Rhizoctonia solani* fue confirmada por la determinación del radio de inhibición en contra de este hongo, además se verificó mediante la observación con microscopio óptico. El sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* V26 contiene quitosanas y proteasa, además de compuestos antifúngicos. [19]

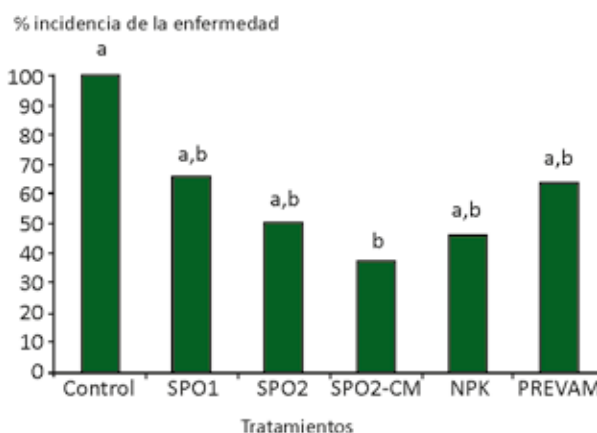
La habilidad de esta cepa para producir quitosanas y proteasa sugiere que esta puede actuar sobre el crecimiento de *Rhizoctonia solani* por antibiosis. De hecho, la actividad de las quitosanas hidroliza el quitosano, el cual se encuentra entre uno de los principales constituyentes de la pared celular del hongo. El sobrenadante del cultivo *Bacillus subtilis* V26 provoca vacuolización y deformación en las hifas de *Rhizoctonia solani*. [19]

Rodajas de patatas fueron tratadas con *Bacillus subtilis* V26 antes y después de inocular el hongo, con el fin de revelar si V26 desarrolla actividades curativas o protectantes. Aunque los dos tratamientos fueron efectivos en reducir la infección fúngica, el control más efectivo fue alcanzado cuando V26 fue aplicado 24 horas antes de la inoculación (actividad protectante). Esto podría ser debido al hecho que las endosporas de *Bacillus subtilis* necesitan tiempo

para germinar antes de que estén listos para inhibir la germinación de *Rhizoctonia solani*.

Las cepas de *Bacillus* mejoran significativamente el crecimiento de las plantas, inhibiendo los patógenos del suelo cuando se usa un tratamiento de suelo. Análisis estadísticos en la pudrición negra y llagas de las raíces causadas por *Rhizoctonia solani* indicaron que hay diferencias significativas entre los tratamientos. La cepa V26 fue capaz de controlar la pudrición negra (81 % eficacia), así como las llagas de las raíces (63 % eficacia) más eficiente que el fungicida comercial Prevam (Decahidrato Tetraborohidrato de sodio). Curiosamente, la cepa V26 parece ser más efectiva en la supresión de la pudrición negra que muchos otros hongos y bacterias antagonistas. [6]

La incidencia de la enfermedad en raíces de todas las plantas tratadas fue significativamente menor que las plantas que no recibieron tratamiento y que fueron usadas como control



**Fig. 3.** Incidencia de *Rhizoctonia solani* en raíces después de 60 días de inoculación del patógeno en un experimento montado en macetas, tratadas con la cepa V26 de *Bacillus subtilis*.

- Control .
- SPO1 106 esporas/mL lavadas en suspensión de esporas .
- SPO2 109 esporas/mL.
- SPO2-CM 109 esporas/mL.
- NPK fertilizante.
- PREVAM fungicida comercial.

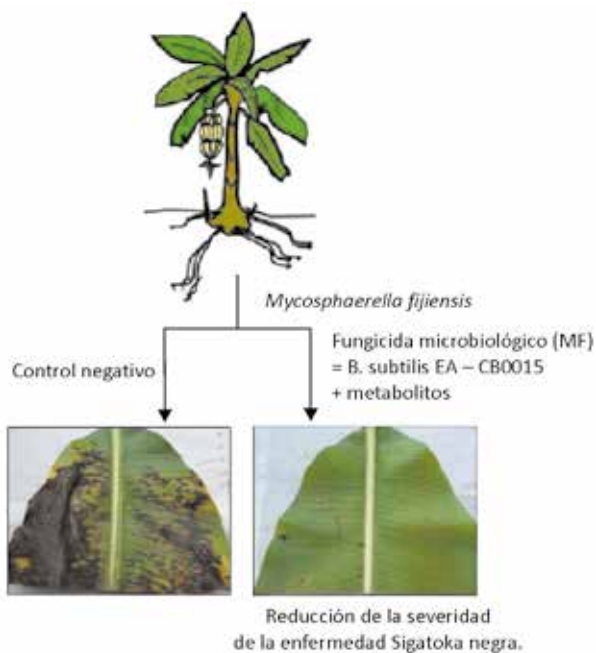
#### • Banano

El cultivo del banano es el cuarto más importante después del arroz, trigo y maíz, es cultivado en regiones tropicales de más de 100 países y juega un rol clave en las economías de muchos países en desarrollo [23].

Entre las enfermedades que reduce la producción de banano está la Sigatoka negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* siendo esta la más peligrosa. El hongo ataca las hojas, disminuyendo el área fotosintética de la planta y causa la maduración prematura de la fruta resultado en significantes pérdidas [24]. Actualmente el control de esta enfermedad mayormente se basa en recurrentes aplicaciones de fungicidas protectantes y sistémicos, los cuales son aplicados vía aérea todo el año en plantaciones que producen banano de exportación [25].

Gutiérrez-Monsalve [25], utilizando un fungicida microbiano a base de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 demuestra mediante experimentos de campo y en invernadero la efectividad de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y sus metabolitos para el control de *Mycosphaerella fijiensis*. El fungicida fue aplicado como una suspensión en agua a una dosis de 1,5 L/ha, la cual fue capaz de reducir la severidad de la enfermedad en el mismo rango de fungicidas como chlorothalonil y mancozeb, fungicidas protectantes comúnmente usados en los programas de control de Sigatoka negra. Además, el fungicida microbiano a 1,5 L/ha mostró ser efectivo cuando se aplica en combinación con fungicidas sistémicos como parte de un programa de control comparable a un programa con fungicidas comercialmente usados para el control de la enfermedad.





**Fig. 4.** Reducción de la severidad de la enfermedad de Sigatoka negra en plantas de *Mycosphaerella fijiensis* utilizando *B. subtilis*.

Los resultados mostraron que se podría introducir un conjunto de herramientas para el control de Sigatoka negra en el cultivo de banano, ya sea como una suspensión en agua o en combinación con fungicidas sistémicos, reduciendo la carga de fungicidas en las regiones productoras y el riesgo del desarrollo de resistencia del patógeno a los fungicidas.

## Conclusiones

Es necesario implementar en el país planes de investigación que permitan profundizar aún más en campo del biocontrol de enfermedades, con la perspectiva de encontrar soluciones viables y conjuntos a los modelos que cada día se van implementando y que se direccionan en métodos que no pongan en riesgo al productor o al medio ambiente.

Los lipopéptidos de *Bacillus subtilis* se enmarcan en agentes biológicos de gran potencialidad, en donde es necesario detallar sus roles, principalmente en las sinergias que podrían desarrollar, no solo entre ellos, sino con otros microorganismos de la rizósfera. Al disponer de buena cantidad de evidencia con respecto de las surfactinas, es necesario entender y ampliar los conocimientos con respecto de las iturinas y las fengycinas.

Una de los grandes retos para los investigadores gira en torno a desarrollar alternativas prácticas para la obtención a gran escala de los lipopéptidos, así como la mejor formulación para las aplicaciones en los cultivos, si bien la evidencia muestra gran efectividad a nivel de laboratorio, es necesario encontrar la mejor forma para que puedan ser aplicadas a campo abierto. En esta revisión, existe suficiente evidencia de la efectividad de los lipopeptidos como controladores de las enfermedades más devastadoras en los cultivos de mayor importancia, pero es necesario determinar formulaciones que faciliten su obtención y aplicación.

## Referencias bibliográficas

- M. Ongena and P. Jacques, "Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol," *Trends in Microbiology*, vol.16, no.3, pp.115–125, 2008.
- Meenu Saraf, Urja Pandya, Aarti Thakkar, "Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens" *Microbiological Research*, 2014
- Bais HP, Fall R, Vivanco JM. Biocontrol of *B. subtilis* against infection of Arabidopsis Roots by *P. syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol* 2004; 134:307–19.
- Phae CG, Shoda M, Kubota H (1990) "Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms." *J Ferment Bioeng* 69:1–7
- Asaka O, Shoda M (1996) "Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14." *Appl Environ Microbiol* 62:4081–4085
- M. Deleu, M. Paquot, and T. Nylander, "Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes," *Biophysical Journal*, vol.94, no.7, pp.2667–2679, 2008.
- Maget-Dana, R. et al. (1992) "Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A." *Biochimie* 74, 1047–1051
- Ongena, M. et al. (2007) "Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants." *Environ. Microbiol.* 9, 1084–1090
- Romero, D. et al. (2007) "The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*." *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 430–440
- Bais, H.P. et al. (2006) "The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms." *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266
- Arrebola, E., Jacobs, R. & Korsten, L. (2010). "Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens." *J. Appl. Microbiol.* 108: 386–395.
- Marrone, P.G. (2002) "An effective biofungicide with novel modes of action." *Pesticide Outlook* 13, 193–194.
- Hsieh, F.C., Lin, T.C., Meng, M. and Kao, S.S. (2008) "Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A." *Curr Microbiol* 56, 1–5.
- Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, et al. "Surfactin and fengycin Lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants." *Environ Microbiol* 2007; 9 (4):1084–90.
- Brar, D.S. & Khush, G.S. 2002. "Transferring genes from wild species into rice." In Kang, M.S. ed. *Quantitative genetics, genomics and plant breeding*, p. 197–217, Oxford, CABI.
- Savary, S., Willocquet, L., Elazegui, F. A., Castilla, N. P., and Teng, P. S. 2000. "Rice pest constraints in tropical Asia: quantification of yield losses due to rice pests in a range of production situations." *Plant Dis.* 84:357–369.
- Gnanamanickam, S.S., Candole, B.L., and Mew, T. W. (1992) "Influence of soil factors and cultural practice on biological control of sheath blight of rice with antagonistic bacteria." *Plant and Soil*, 144: 67–75.
- S. Ben Khedher, et al., "Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato," *C. R. Biologies* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2015.09.005>
- W. Pérez y G. Forbes (2011). "Guía de identificación de plagas que afectan a la papa en la zona andina. Centro Internacional de la Papa" (CIP). 44 pags.
- R. Grosch, K. Scherwinski, J. Lottmann, G. Berg, "The most promising candidates were applied in field trials. Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community," *Microbiol. Res.* 110 (2006) 1464–1474.
- C.D. De Jensen, J.A. Percich, P.H. Graham, "Integrated management strategies of bean root rot with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minnesota," *Field Crop. Res.* 74 (2002) 107–115.
- Frison, E.A., Escalant, J.V., Sharrock, S., 2004. "The global *Musa* genomic consortium: A boost for banana improvement, in: Mohan Jain, S., Swennen, R. (Eds.), *Banana improvement: Cellular, molecular biology, and induced mutations*. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA.
- Marín, D.H., Romero, R.A., Guzmán, M., Sutton, T.B. 2003. "Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation." *Plant Dis.* 87, 208–222.
- Gutierrez-Monsalve, J.A., Mosquera, S., González-Jaramillo, L.M., Mira, J.J., VillegasEscobar, V., "Effective control of black Sigatoka disease using a microbial fungicide based on *Bacillus subtilis* EACB0015 culture," *Biological Control* (2015), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.012>

**Recibido:** 3 de junio de 2016.

**Aprobado:** 10 de julio de 2016.

## ARTÍCULO DE REVISIÓN

## Banco de recursos genéticos de *Auricularia spp.* con fines industriales

### Bank of genetic resources *Auricularia spp.* for industrial purposes

Edwin Ortiz<sup>1</sup>, Claudia Soto Arroyave<sup>2</sup>, Carlos Saransi<sup>1</sup>, Klever Ayala<sup>1</sup>, Lucía Faz<sup>1</sup>, Napoleón Benavides<sup>1</sup>, Pablo Vela<sup>1</sup>, Patricia Rosero<sup>3</sup>, William Gómez<sup>1</sup>, José Huaca Pinchao<sup>3</sup>, Gustavo Reyes Lara<sup>3</sup>, Rubén Darío Guzmán Torres<sup>4</sup>, Guillermo Parrado Castro<sup>5</sup>, Stefania Duarte Trujillo<sup>5</sup>, Alejandro Pineda Soto<sup>6</sup>.

## RESUMEN

La *Auricularia spp.* presenta amplio potencial industrial debido a sus propiedades nutricionales y medicinales. La obtención de cepas viables y puras de este género se ha visto limitada por una identificación de especies meramente macroscópica y la utilización tanto de medios como técnicas de conservación inadecuados. El objetivo de esta revisión fue describir el proceso de obtención de cepas puras y viables del género *Auricularia spp.* a partir del medio natural, para resaltar datos técnicos, que faciliten la conformación de bancos de recursos genéticos fúngicos. Estos fungarios constituyen una alternativa para la preservación la biodiversidad fúngica del Ecuador y la obtención de cepas puras y viables. Lo anterior se logra con buenas prácticas de identificación tanto fenotípica como genotípica, de aislamiento en medio selectivos para evitar la inhibición competitiva por otros microorganismos, de conservación y de almacenamiento de especies por congelación, liofilización, repique o inmersión en líquidos inertes como agua o aceite mineral.

**Palabras clave:** *Auricularia spp.*, recursos genéticos, biodiversidad fúngica, aprovechamiento industrial.

## ABSTRACT

*Auricularia spp.* has broad industrial potential due to its nutritional and medicinal properties. Obtaining viable and pure strains of this genus has been seen limited by a merely macroscopic identification of species and the utilization of both inadequate mediums and inadequate conservation techniques. The objective of this review was to describe the process of obtaining pure and viable strains of the genus *Auricularia spp.* from the natural environment, to highlight technical data that facilitate the establishment of banks of fungal genetic resources. These fungarios are an alternative for preserving the fungal biodiversity of Ecuador and obtaining pure and viable strains. This is achieved with good practices of phenotypic and genotypic identification, isolation on selective medium to avoid competitive inhibition by other microorganisms, conservation and storage of species by freezing, lyophilization, peal or immersion in inert liquids such as water or oil mineral.

**Keywords:** *Auricularia spp.*, genetic resources, biodiversity fungal, industrial use.

## Introducción

Se estima que existen en la naturaleza más de 1,5 millones de especies de hongos, de las cuales sólo se han descrito alrededor de 69 000<sup>1</sup>. Tan sólo en el Ecuador se han estimado más de 100 000 especies de hongos<sup>2</sup> y descrito tan solo 5 000<sup>3</sup>. Sin embargo, no se posee ningún registro oficial acerca de la cantidad de hongos que se encuentran en el territorio nacional; aunque existen colecciones útiles para la obtención de cepas fúngicas con propósitos académicos<sup>4</sup>. Una de las más importantes es el Fungario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE)<sup>5</sup>, el cual cuenta con más de 6 000 ejemplares, que fueron catalogados

mediante la realización de proyectos de cooperación internacional<sup>6</sup>.

Los bancos de recursos genéticos permiten identificar y conservar las especies fúngicas para su posterior estudio y uso, convirtiéndose además, en fuentes confiables para la obtención de cepas fúngicas puras genéticamente estables necesarias para la puesta en marcha de procesos productivos eficientes<sup>7,8,9</sup>. El aprovechamiento de hongos filamentosos en los sectores alimenticio, cosmetológico y farmacéutico ha impulsado la formación de bancos de recursos genético con especies fúngicas de interés<sup>10</sup>.

Estudios realizados a diversas especies del género *Auricularia spp.* han demostrado su potencial para la

<sup>1</sup> Universidad Técnica del Norte (UTN), Ibarra, Ecuador.

<sup>2</sup> Universidad Católica de Oriente (UCO), Rionegro, Antioquia, Colombia.

<sup>3</sup> Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA), Ibarra, Ecuador.

<sup>4</sup> Ingenio Azucarero del Norte (IANCEM), Ibarra, Ecuador.

<sup>5</sup> Universidad de los Llanos (UNILLANOS), Villavicencio, Colombia.

<sup>6</sup> Escuela Politécnica Nacional (EPN), Quito, Ecuador.

Correspondencia: jpineda@utn.edu.ec



producción de biomasa y metabolitos secundarios, sin embargo, se desconoce el proceso a seguir para la conservación de cepas de interés, lo que conlleva a limitaciones tecnológicas en la identificación de las especies a nivel tanto fenotípico como genotípico, y en la selección de medio apropiados para el aislamiento<sup>11, 12</sup>.

El objetivo de esta revisión es describir el proceso de obtención de cepas del género *Auricularia* spp. a partir del medio natural, para resaltar datos técnicos, que por desconocimiento y no aplicación han obstaculizado la obtención de cepas puras y viables con fines tanto industriales como académicos. Hongo oreja de palo (*Auricularia* spp.)

*Auricularia* spp. es una seta producida a escala industrial, perteneciente a la familia Auriculariaceae, ampliamente conocida como hongo oreja u oreja gelatinosa de palo. Se han descrito alrededor de quince especies<sup>13-15</sup>; entre ellas se encuentran: *A. auricula*, *A. polytricha*, *A. delicata*, *A. mesentérica*, *A. cornea*, *A. peltata*, *A. fuscosuccinea*, y *A. auricula-judae*; siendo las dos primeras las más producidas y estudiadas a nivel mundial<sup>16</sup>. Crece de forma natural en los tallos y las raíces de algunos árboles, así como en materiales de madera en descomposición<sup>14,15</sup>, lo que se debe al sistema enzimático que tiene para degradarlo; principalmente celulasas, hemicelulasas y ligninasas<sup>17,18</sup> the validity of the generally accepted, major decay types (white, brown, and soft rot. La *Auricularia* spp puede crecer sobre la madera húmeda (Fig. 1).

Según Chang y Miles<sup>19</sup>, este hongo fue el primero en cultivarse a nivel mundial, en China, hace 2 600 años. Actualmente, es el cuarto hongo más consumido a nivel mundial después de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*<sup>20</sup>. Su producción a escala industrial representa una excelente alternativa para el reciclaje de residuos agroindustriales y la generación de proteína unicelular. Este hongo presenta una larga vida de anaquel<sup>21</sup>, aunque su palatabilidad se ha visto limitada por su textura correosa<sup>15</sup>.

La Fermentación en Estado Sólido (FES) es uno de los métodos más empleados para la producción industrial de esta especie fúngica, en la cual se utiliza una amplia gama de sustratos lignocelulósicos como fuente de nutrientes y medio para su desarrollo<sup>22</sup>, destacándose el aserrín de madera, cascarilla de arroz, tusa, bagazo de caña, paja de trigo y paja de sorgo<sup>23</sup>. Residuos menos convencionales como pulpa de café<sup>24</sup>, residuos del prensado de la oliva<sup>25</sup>, hojas de plátano, fibra de coco, cáscaras de cacao<sup>26</sup>, hojas y raquis de palma de aceite<sup>27</sup> y demás residuos de poscosecha<sup>28</sup> también han mostrado ser aptos para la producción de *Auricularia* spp. Otros autores han mezclado diferentes sustratos lignocelulósicos para formular medios que cumplan los requerimientos nutricionales del hongo y aumenten sus rendimientos<sup>27,29</sup>. También se reporta la adición de suplementos orgánicos al medio con el fin de compensar la escasez de minerales y vitaminas, necesarios para la obtención de altos rendimientos de producción<sup>30,31</sup>.



Fig. 1. *Auricularia* spp. que ha crecido sobre troncos en descomposición.

Fuente: cortesía de Edwin Ortiz.

## Recolección

Se identifican macroscópicamente los cuerpos fructíferos. Entre las principales características a evaluar, se encuentran el color, la textura, y el tamaño de las colonias. Las especies del género *Auricularia* spp. se caracterizan por poseer cuerpos fructíferos cerosos (Fig. 2) y cartilaginoso que varían el color marrón a negro violáceo<sup>32</sup>. Por tanto, es fácil reconocer los hongos que pertenecen a este género; sin embargo, la identificación a nivel de especie es una tarea difícil, dada la gran diversidad morfológica que poseen los distintos cuerpos fructíferos<sup>33</sup> (Fig. 3).



Fig. 2. Cuerpos fructíferos cartilaginosos de *Auricularia* spp.

Fuente: cortesía de Edwin Ortiz.



Fig. 3. Recolección de carpóforos de *Auricularia* spp.

Fuente: cortesía de Nicolás Ortiz.

## Aislamiento

Los hongos se aíslan del medio natural con el fin de obtener cepas puras para emplearlas como semilla o inóculo sobre el sustrato<sup>26</sup>. El aislamiento de la cepa puede hacerse a partir de las esporas del cuerpo fructífero o de la carne del mismo (micelio anastomosado)<sup>15</sup>. El empleo del micelio inóculo presenta ventajas frente a las esporas ya que las hifas no requieren de una compatibilidad sexual para fructificar, como es el caso de las esporas<sup>34</sup>.

El uso de medios selectivos para el desarrollo de distintos hongos es una técnica que favorece crecimiento de cultivos axénicos. La acidificación del medio de cultivo es una estrategia para la inhibición de bacterias, gracias a que la mayoría de especies como *Auricularia* se desarrollan en un pH ácido; además, la adición de antibióticos garantiza la inhibición de dichos contaminantes microbianos<sup>35</sup>. Según Quimio<sup>36</sup> los medios de cultivo más eficientes para el aislamiento de especies del género *Auricularia* spp., en orden descendente son: glucosa-extracto de levadura, extracto de malta y extracto de papa. Una vez aislado el hongo en cajas de

Petri o tubos de ensayo (Fig. 4), debe mantenerse en refrigeración y repicarse periódicamente para evitar el envejecimiento de la cepa<sup>15</sup>. Es necesario contar con una cámara de flujo laminar para favorecer la axenia de los cultivos; el empleo de mecheros de bunsen no es muy efectivo.



**Fig. 4.** Screening de cepas en cajas de Petri con agar selectivo.

**Fuente:** Cortesía de Julio Pineda, CEBA.

## Identificación

Se basa principalmente en la identificación de las características microscópicas del hongo mediante observación tanto del micelio como de sus estructuras reproductivas utilizando lactofenol o azul de algodón como reveladores de microscopía (Fig. 5). Las características tanto macroscópicas como microscópicas son comparadas con las claves taxonómicas existentes en la literatura, con el fin de clasificar la especie fúngica<sup>33</sup>. Actualmente, existe una base de datos con claves taxonómicas denominada FUNGIPEDIA<sup>37</sup>, disponible gratuitamente en la web.

Kobayashi<sup>11</sup> propuso como base para la identificación de las distintas especies de este género las características morfológicas de los cuerpos fructíferos, la estructura del tejido, los filamentos en la superficie superior, el color del himenóforo, la zona pilosa y el tamaño de la capa medular. Una de las formas para diferenciar algunas de las especies del género *Auricularia* según Lowy<sup>38</sup>, se basa en la existencia o carencia de una capa medular intermedia en las hifas. Especies como *A. córnea*, *A. fuscossuccinea*, *A. tenuis*, *A. emini* y *A. polytricha* poseen capa medular, mientras que especies como *A. auricula-judae*, *A. delicata*, *A. mesentérica*, *A. ornata*, y *A. peltata* no poseen esta estructura<sup>12</sup>. *A. córnea*, *A. fuscossuccinea*, *A. tenuis*, *A. emini* y *A. polytricha* poseen capa medular, mientras que especies como *A. auricula-judae*, *A. delicata*, *A. mesentérica*, *A. ornata*, y *A. peltata* no poseen esta estructura<sup>12</sup>. No obstante, todas las características físicas mencionadas pueden verse afectadas por las condiciones de cultivo, como la temperatura, la humedad, la luz y la ubicación de la seta sobre el sustrato<sup>11</sup>.

Actualmente, la identificación de especies o cepas fúngicas puede realizarse mediante estudios filogenéticos moleculares que secuencian el ADN nuclear presente en las estructuras fúngicas, lo que permite establecer grados de emparentamiento entre hongos e identificar infinidad de especies con una mayor exactitud<sup>12</sup>. La amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés), es una tecnología filogénica que ha sido empleada para la diferenciación de cepas individuales de *A. auricula* y *A. polytricha*, que no pueden ser discriminadas por polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés)<sup>20</sup>.

## Caracterización fisicoquímica

Nutricionalmente, *Auricularia spp.* contiene altos niveles de proteína (aproximadamente el 30 % en base seca) y de ele-



**Fig. 5.** Identificación de características microscópicas del hongo.

**Fuente:** Cortesía de Stefania Duarte. Laboratorio de microbiología Universidad de los Llanos.

mentos esenciales como vitaminas, minerales (Ca, P, Fe), y polisacáridos<sup>23</sup>. Según Stamets<sup>39</sup> la composición nutricional de *A. auricula* en base seca es: 8-10 % de proteína; 0,8-1,2 % de grasa; 84-87 % de carbohidratos; 9-14 % de fibra y 4-7 % de cenizas. Teniendo en cuenta que su contenido de agua es de aproximadamente el 90 %. El cuerpo fructífero de *A. auricula* es rico en heteropolisacáridos, que están conformados por una cadena principal de residuos de D -glucosa con varias cadenas laterales de residuos  $\beta$ -1,3 como manosa, glucosa, xilosa y ácido glucurónico<sup>40</sup>. Adicional a sus propiedades nutricionales, cuenta con propiedades medicinales debido a que esta especie posee una gran gama de compuestos bioactivos favorables para la salud, lo que le convierte en un alimento nutracéutico o funcional de alta calidad. En la tabla se resumen las principales bioactividades de *Auricularia spp.*

Las propiedades medicinales de *Auricularia spp.* otorgan aplicaciones terapéuticas potenciales a sus compuestos bioactivos. Los polisacáridos de *Auricularia aurea* con carga negativa han sido empleados para formar polielectrolitos catiónicos en medio ácido de bajo peso molecular tras unión con quitosano, con el fin de servir como biopelícula y vehículo para fármacos proteicos hacia el intestino, donde se biodegrada y los libera<sup>41</sup>. La melanina se aplica industrialmente como pigmento natural, antioxidante y agente antibacterial en los sectores alimenticio, cosmético, farmacológico, entre otros<sup>42</sup>. Así mismo, los polisacáridos de *A. auricula* han sido empleados por su actividad antioxidante como conservantes de enlatados, principalmente escabeche<sup>43</sup> ISSN: "01418130", "abstract": "The study planned to determine proximate composition, antioxidant activity and chemical characterization in the fruit bodies of *Auricularia auricula* and pickled product. Two polysaccharide fractions (AAPF, AAPP y como suplementos de la harina de trigo para la elaboración de panes enriquecidos<sup>44</sup>.

## Conservación y almacenamiento de cepas puras

El mantenimiento y la preservación de especies fúngicas asegura la estabilidad genética de las cepas y sus particularidades fenotípicas. La elección del método adecuado dependerá del tipo de hongo a preservar, la cantidad de especies o cepas, la finalidad del espécimen y los recursos humanos y financieros disponibles<sup>45</sup>.



Tabla. Principales actividades biológicas de *Auricularia* spp.

Bioactividad	Variiedad	Compuesto bioactivo	Referencia
Antibacterial	<i>A. auricular</i> , <i>A. polytricha</i>	Melanina, eumelanina, feomelanina, compuestos solubles en etanol.	42,62,63
Antiviral	<i>A. auricula - judae</i>	Malondialdehído, ácido ascórbico, glutatión reducido, superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa.	64
Antioxidante	<i>A. auricula</i> , <i>A. polytricha</i> , <i>A. fuscusuccinea</i>	Ácido ascórbico, tocoferoles, fenoles totales, polisacáridos, polisacáridos sulfatados y polisacáridos carboximetilados (los dos últimos tienen mayor actividad biológica)	40,65–69
Antiinflamatoria	<i>A. auricula - judae</i>	Glucuronoxilomananos, glucuronoxiloglucomananos, glucanos	70
Inmuno-moduladora	<i>A. auricula</i> , <i>A. polytricha</i>	Polisacáridos sulfatados, proteínas simples sin hidratos de carbono	71–73
Antitumoral	<i>A. auricula - judae</i> , <i>A. polytricha</i>	Diazane, heteroglicanos ácidos, betaglucanos ( $\alpha$ -1,3; $\alpha$ -1,4; $\beta$ -1,3), D-glucopiranosil (1,4)	74–77
Cardioprotectora	<i>A. auricula</i>	Polisacáridos	78
Hipolipemiente	<i>A. auricula</i> , <i>A. polytricha</i>	Polisacáridos solubles en agua	79–81 { "id" : "ITEM-2", "itemData" : { "DOI" : "10.1016/j.ifset.2008.06.004", "ISSN" : "14668564", "abstract" : "Auricularia auricula and hawthorn are well known for both traditional food and folk medicine. To develop a novel healthy functional diet (FD
Hipoglicémico	<i>A. auricula-judae</i>	Polisacáridos solubles en agua	82
Anticoagulante, antiplaquetario	<i>A. auricula</i>	Polisacáridos ácidos	83



Fig. 6. Laboratorio de Microbiología del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA).

Fuente: cortesía de Edwin Ortiz.

Adicionalmente, se requiere de unas instalaciones adecuadas que garanticen la asepsia (Fig. 6). Algunos de los métodos para la conservación y almacenamiento de cepas fúngicas son:

**Transferencia periódica:** Este método consiste en repicar periódicamente el microorganismo en un medio de cultivo fresco cada vez que el organismo consuma los nutrientes del cultivo predecesor, brindándole las condiciones óptimas para su desarrollo <sup>46</sup>. Este método es poco recomendable ya que las células se siguen multiplicando obteniendo como resultado descendientes

lejanos de las células iniciales, lo que puede ocasionar la pérdida de características propias del hongo y la modificación de su información genética consecuencia de la alternancia generacional <sup>45</sup>.

**Liofilización:** La liofilización se basa en la restricción de la actividad metabólica causada por la eliminación de agua del tejido fúngico almacenado, a través de un proceso de congelación y sublimación. Este proceso al igual que el de congelación requiere el uso de sustancias criopreservantes, pero de menor punto de evaporación en el que se suspende el material a liofilizar <sup>47</sup>. Una de las ventajas de la aplicación de este método es que permite almacenar los liófilos a temperatura ambiente, facilitando las labores de envío de cepas y disminuyendo costos causados por el uso de sistemas de refrigeración <sup>48</sup>.

**Congelación:** La congelación o criopreservación es un método ampliamente utilizado actualmente para la conservación de hongos <sup>47,49</sup>. Este consiste en almacenar el tejido fúngico en suspensión en un agente crioprotector líquido a temperaturas menores a cero grados centígrados, congelando el agua en el tejido, lo que limita la disponibilidad de agua líquida para las células, disminuyendo además las funciones metabólicas de las mismas. Es importante tener en cuenta el uso de sustancias criopreservantes como el glicerol para evitar una posible lisis celular causada por la formación de cristales de hielo en el interior de la célula, además este método requiere del uso especial de equipos que mantengan la temperatura de almacenamiento para evitar la reactivación de las células, por tanto demanda un mayor consumo energético ocasionando un incremento en los costos <sup>50</sup>.

**Inmersión en aceite mineral:** Este método consiste en almacenar trozos de hongos desarrollados, en tubos de ensayo que contienen agar distribuido en la superficie interna del mismo, el

cual posteriormente se recubre con una capa de aceite mineral estéril<sup>51,52</sup>. A través de la conservación de cepas por este método se reportan tiempos de almacenamiento de hongos filamentosos que van de los 3 a los 47 años, logrando un gran porcentaje de material puro y viable<sup>53</sup>.

**Inmersión en agua destilada estéril:** El método de preservación en agua destilada estéril es reconocido por ser un método sencillo y económico, que asegura la preservación exitosa de cultivos fúngicos por tiempo prolongado sin que disminuya la viabilidad de las cepas. Consiste en seleccionar muestras de tejido desarrollado (esporas o hifas) depositándolas en recipientes con agua destilada estéril para ser almacenados<sup>53-55</sup>.

## Banco de recursos genéticos

El Plan de Acción Mundial (PAM) para la Conservación y la Utilización Sostenible de los Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación (RFAA), propuesto en la Cuarta Conferencia Técnica Internacional sobre RFAA (1996) y adoptado por más de 150 países incluyendo a Ecuador, establece como objetivo aumentar la seguridad alimentaria mundial mediante la conservación y la utilización sostenible de los recursos fitogenéticos<sup>56</sup>. Este plan prioriza la conservación de la diversidad genética de los recursos que permitan afrontar la crisis alimentaria, mediante la utilización de técnicas de conservación in situ y ex situ del genoma de especies con potencial genético para la producción sostenible. El Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos (DENAREF) lidera el Banco Nacional de Germoplasma del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) del Ecuador, la cual es la institución pública más relevante en cuanto al número de especies almacenadas en bancos de germoplasma se refiere en el país; sin embargo, esta colección no incluye al reino fungi<sup>57,58</sup>.

Por su parte, el Fungario QCA (M) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la PUCE<sup>5</sup> cuenta con más de 6 000 ejemplares representados en al menos 40 órdenes y 112 familias, provenientes de 19 provincias; siendo considerada la colección más grande de este tipo en el país. Ha logrado aumentar significativamente su número de especímenes gracias a dos cooperaciones internacionales: Con la British Mycological Society en 1993 y la Universidad de Copenhague durante los años 2002 a 2004. El fungario tiene un proyecto estudiantil de acción social en la Reserva orquideológica El Pahuma, donde se han identificado y recolectado varias especies de hongos, entre las que se encuentra *Auricularia* spp.

El éxito para el establecimiento de un banco de recursos genéticos de cualquier cepa fúngica se basa en la conservación de la pureza, preservación de la viabilidad y la estabilidad genética de los tejidos almacenados<sup>45</sup>.

## Selección de cepas de interés

La selección de determinadas cepas fúngicas para la producción de biomasa se realiza a través de una serie de análisis o ensayos que relacionen los aspectos de mayor relevancia para su producción industrial en pro de la obtención de características de interés. Pruebas de crecimiento micelial<sup>59,60</sup> son algunos de los aspectos a tener en cuenta. Una vez establecida la cepa se procede a realizar labores de aislamiento e identificación que ratifiquen la correcta escogencia del material fúngico a reproducir. Ensayos de reproductibilidad en placas de Petri y la realización de cultivos a pequeña escala son métodos de selección que permiten evidenciar los factores anteriormente mencionados.

## Conclusiones

Los bancos de recursos genéticos fúngicos o fungarios son una alternativa para preservar la biodiversidad de hongos del

Ecuador; constituyéndose como un soporte para la realización de estudios de biología molecular y aplicaciones industriales. El éxito para el establecimiento de un banco de recursos genéticos de *Auricularia* spp. se basa en la conservación de la pureza, preservación de la viabilidad y la estabilidad genética de los tejidos almacenados. Lo anterior se logra con buenas prácticas de identificación tanto fenotípica como genotípica, de aislamiento en medio selectivos para evitar la inhibición competitiva por otros microorganismos, de conservación y de almacenamiento de especies por congelación, liofilización, repique o inmersión en líquidos inertes como agua o aceite mineral.

## Agradecimientos

El proyecto de investigación que abarca esta publicación ha contado con la cooperación del Ingenio Azucarero del Norte (IAN) y del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA).

## Referencias bibliográficas

- Hawksworth DL. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res.* 1991;95(6):641-655. doi:10.1016/S0953-7562(09)80810-1.
- Hawksworth DL. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res.* 2001;105(12):1422-1432. doi:10.1017/S0953756201004725.
- Freire Fierro A. *Botánica Sistemática Ecuatoriana*. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press ix; 2004.
- Universidad Técnica Particular de Loja. Museo de Colecciones Biológicas de la UTPL.
- Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Fungario QCA (M).
- Læssøe T, Petersen JH. Fungi of Ecuador. University of Copenhagen University of Aarhus, Denmark.
- Cruz DJ. Fungario. Museo de Colecciones Biológicas de la Universidad Técnica Particular de Loja.
- Ramírez P, Cocha JM. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Rev peru biol.* 2003;10(1):67-77.
- Badía M, Hernández B. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev Bras ...* 2011;6:90-99.
- Marinelli F, Molinari F. Las fermentaciones en la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico. *Monogr XXXV Biocatálisis Apl a la obtención fármacos y Prod alto valor añadido*. 2012:61-104. doi:http://dx.doi.org/ES/monoranf.v0i0.1314.
- Kobayashi Y. The genus *Auricularia*. *Bull Natl Sci Mus Tokyo B.* 1981;7:41-67.
- Montoya-Alvarez A, Hayakama H, Minamya Y, Fukuda T, López-Quintero C, Franco-Molano A. Phylogenetic Relationships and Review of the Species of *Auricularia* (Fungi: Basidiomycetes) in Colombia. *Caldasia.* 2011;33(1):55-66.
- Ainsworth GC. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. 10ª ed. UK: Cabi; 2008.
- Oei P. Environmental care: an integrated approach. *Mushroom Cultiv.* 1996:38Y43.
- Guzmán G, Mata G, Dulce S, Soto-Velazco C, Guzmán-Dávalos L. *El Cultivo De Los Hongos Comestibles: con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales*. 1ª ed. Xalapa, Veracruz: Instituto Politécnico Nacional; 1993. http://mushroomtime.org/wp-content/uploads/2014/06/07-El-cultivo-de-los-hongos-comestibles-GUZMAN-G-INECOL-.pdf.
- Cheng S, Tu CC. *Auricularia* spp. En: Chang S, Hayes WA, eds. *The biology and cultivation of edible mushrooms*. New York: Academic press; 2013:605-624. https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=yngBAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=The+biology+and+cultivation+of+edible+mushrooms+chang&ots=6sEOS37eXd&sig=mrUP2QcQpIO6Xm19qD0L-VpDHPe&redir\_esc=y#v=onepage&q&f=false.
- Adejumo TO. Qualitative Determination of Lignocellulolytic Enzymes in Eight Wood-Decomposing Fungi. *J Nat Sci Res.* 2015;5(14):1-8. https://www.researchgate.net/publication/283438797\_Qualitative\_

- Determination of Lignocellulolytic Enzymes in Eight Wood-Decomposing Fungi.
18. Worrall JJ, Anagnost SE, Zabel RA. Comparison of Wood Decay among Diverse Lignicolous Fungi. *Mycologia*. 1997;89(2):199–219. doi:10.2307/3761073.
  19. Chang S-T, Miles PG. Historical record of the early cultivation of *Lentinus* in China. *Mushroom J Trop*. 1987;7:31–37.
  20. Yan P-S, Luo X-C, Zhou Q. RAPD molecular differentiation of the cultivated strains of the jelly mushrooms, *Auricularia auricula* and *A. polytricha*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2004;20(8):795–799. doi:10.1007/s11274-004-5840-y.
  21. Sánchez-Vázquez, J. E. Huerta G, Calvo L. Potential of *Auricularia* sp. in the recycling of agroindustrial waste products in the tropics. *Mushroom Sci*. 1995;14:877–883.
  22. Belur P, Mugeraya G. Microbial Production of Gibberellins : State of the Art. *Res J Microbiol*. 2011;6(1):25–40. doi:10.3923/jm.2011.25.40.
  23. Chang S-T, Miles PG. *Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. 2ª ed. (Eds., ed.). Florida: CRC Press; 2004. <http://books.google.com/books?id=XO4EG-zpp1M0C&pgis=1>.
  24. Sharma VP, Jandaik CL. Supplementation of wheat straw for the improved yields of black ear mushroom (*Auricularia polytricha*). *Mushroom Res*. 1992;1(1).
  25. Reina R, Liers C, Ocampo JA, García-Romera I, Aranda E. Solid state fermentation of olive mill residues by wood- and dung-dwelling Agaricomycetes: Effects on peroxidase production, biomass development and phenol phytotoxicity. *Chemosphere*. 2013;93(7):1406–1412. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.07.006.
  26. Carreño-Ruiz SD, Cappello-García S, Gaitán-Hernández R, Edmundo JC-B. Crecimiento de tres hongos comestibles tropicales en medios de cultivo y residuos agrícolas. *Rev Mex Ciencias Agrícolas*. 2014;5(8):1447–1458.
  27. Abd Razak DL, Abdullah N, Khir Johari NM, Sabaratnam V. Comparative study of mycelia growth and sporophore yield of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc on selected palm oil wastes as fruiting substrate. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(7):3207–3213. doi:10.1007/s00253-012-4135-8.
  28. Qiang W. Method for cultivating *auricularia polytricha* through wild jujube branch sawdust. 2015. <https://patents.google.com/patent/CN104956924A/en?q=auricularia&q=culture&q=substrate>.
  29. Morales GE, Huerta-Palacios G, Sánchez-Vázquez JE. Production technology optimization for *Auricularia fuscusuccinea*. En: Griensven LJLD (Van. ., ed. *Science and cultivation of edible fungi. Proceedings of the 15th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, Maastricht, Netherlands, 15-19 May, 2000*. A.A. Balkema Publishers; 2000:943–948. <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=TOEMcHwWRAsC&oi=fnd&pg=PA943&dq=agroindustrial+wastes+auricularia&ots=-eNI3oS-ft&sig=8Pm-dec9NByzhEXL5GZkA4hKIUQ#v=onepage&q=agroindustrial+wastes+auricularia&f=false>.
  30. Isikhuemhen OS, Okhuoya JA, Ogboe EM, Akpaja E. Effect of substrate supplementation with nitrogen, phosphorus, potassium (NPK) fertilizer on sporophore yield in *Pleurotus tuber-regium*. *Micol Neotrop Apl*. 1999;12:9–21.
  31. Mane VP, Patil SS, Syed AA, Baig MMV. Bioconversion of low quality lignocellulosic agricultural waste into edible protein by *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2007;8(10):745–751. doi:10.1631/jzus.2007.B0745.
  32. Lowy B. A morphological basis for classifying the species of *Auricularia*. *Mycologia*. 1951;43(3):351–358. doi:10.2307/3755598.
  33. Hoog de GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi*. 2ª ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS); 2000.
  34. Pichel JA. El Banco de Germoplasma de Salamanca, pionero en el estudio y conservación de hongos. *Agencia Iberoamericana para la difusión de la ciencia y la tecnología Conservación y almacenamiento de cepas puras*. febrero 2012.
  35. Ames de Icochea T. *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Lima, Perú: International Potato Center; 2004.
  36. Quimio TH. Physiological considerations on *Auricularia* spp. En: Chang S-T, Quimio TH, eds. *Tropical Mushroom-Biological Nature and Cultivation Methods*. 1ª ed. Hong Kong: The Chinese University Press; 1982:397–408. <https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=OluzyrBPARGC&oi=fnd&pg=PR19&dq=Tropical+mushrooms+Biological>.
  37. Asociación Micológica Fungipedia. Fungipedia. <https://www.fungipedia.org/>.
  38. Lowy B. The Genus *Auricularia*. *Mycologia*. 1952;44(5):656–692. <http://www.jstor.org/stable/4547639>.
  39. Stamets P. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Vol 2. 3ª ed. Berkeley, California: Ten Speed Press; 2000. <https://goo.gl/5QzDMb>.
  40. Yang L, Zhao T, Wei H, et al. Carboxymethylation of polysaccharides from *Auricularia auricula* and their antioxidant activities in vitro. *Int J Biol Macromol*. 2011;49(5):1124–1130. doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.09.011.
  41. Xiong W, Zhang Q, Yin F, et al. *Auricularia auricular* polysaccharide-low molecular weight chitosan polyelectrolyte complex nanoparticles: Preparation and characterization. *Asian J Pharm Sci*. 2016;11(3):439–448. doi:10.1016/j.ajps.2015.10.064.
  42. Zhu H, He C-C, Chu Q-H. Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by pigments extracted from *Auricularia auricular*. *Lett Appl Microbiol*. 2011;52(3):269–274. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02993.x.
  43. Khaskheli SG, Zheng W, Sheikh SA, et al. Characterization of *Auricularia auricula* polysaccharides and its antioxidant properties in fresh and pickled product. *Int J Biol Macromol*. 2015;81:387–395. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.08.020.
  44. Fan L, Zhang S, Yu L, Ma L. Evaluation of antioxidant property and quality of breads containing *Auricularia auricula* polysaccharide flour. *Food Chem*. 2007;101(3):1158–1163. doi:10.1016/j.foodchem.2006.03.017.
  45. García MD, Uruburu F. La conservación de cepas microbianas. *Actual SEM*. 2000;30(1):12–16. [https://www.sem microbiologia.org/pdf/actualidad/SEM30\\_12.pdf](https://www.sem microbiologia.org/pdf/actualidad/SEM30_12.pdf).
  46. Leal, Sánchez LC, Corrales Ramírez LC. Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. *Nova*. 2005;3(3).
  47. Moraes-Borba de C, Rodrigues DF. Viability and sporulating capability of Coelomycetes preserved under a range of different storage regimes. *Rev Iberoam Micol*. 2000;17(4):142–145.
  48. Arun PR, Azeze PA. Development of a novel lyophilization protocol for preservation of mushroom mycelial cultures. *CurrSci*. 2004;87(5):568–570. <http://www.iisc.ernet.in/currsci/sep102004/568.pdf>.
  49. Carmichael JW. Frozen Storage for Stock Cultures of Fungi. *Mycologia*. 1956;48(3):378–381. <http://www.jstor.org/stable/3755355>.
  50. Bosmans J. Ten years lyophilization of pathogenic fungi. *Mycopathol Mycol Appl*. 1974;3:13–23.
  51. Buell CB, Weston WH. Application of the Mineral Oil Conservation Method to Maintaining Collections of Fungous Cultures. *Am J Bot*. 1947;34(10):555–561. <http://www.jstor.org/stable/2437337>.
  52. Ferreti-de-Lima R, De-Moraes-Borba C. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. *Rev Iberoam Micol*. 2001;18(4):191–196.
  53. Panizo MM, Reviákina V, Montes W, González G. Mantenimiento y Preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *RevSocVenMicrobiol*. 2005;25(1):1–9.
  54. Bueno L, Gallardo R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Rev Iberoam Micol*. 1998;5:166–168.
  55. Qiangqiang Z, Jiajun W. Fungi Using Sterile Distilled. 1998;257:255–257.
  56. Comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura -FAO-. *Segundo plan de acción mundial para los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura*.; 2011.
  57. DENAREF. Departamento Nacional de Recursos fitogenéticos: misión, visión, objetivos, actividades. Documento de difusión. 2011:6. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2660>.
  58. Tapia C, Zambrano E, Montero A. *Estado de los Recursos Filogenéticos para la Agricultura y Alimentación en el Ecuador. Publicación Miscelánea No. 114*. Quito; 2008.
  59. Adenipekun C., Lawal R, Isikhuemhen O. . Effect of growth supporting additives on the performance of *Auricularia auricula* on *Mansonia altissima* A . chev sawdust. *Int Food Res J*. 2015;22(5):2167–2173.
  60. Zervakis G, Philippoussis a, Ioannidou S, Diamantopoulou P. Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiol (Praha)*. 2001;46(3):231–234. doi:10.1007/BF02818539.
  61. Onyango B., Palapala V., Arama P., Wangai S., Gichimu B. Morphological characterization of Kenyan native wood ear mushroom [Au-



- ricularia auricula (L. ex Hook.) Underw.] and the effect of supplemented millet and sorghum grains in spawn production. *Agric Biol J North Am.* 2011;2(3):407-414. doi:10.5251/abjna.2011.2.3.407.414.
62. Li B, Dong M. Inhibition effect of extract from *Auricularia auricular* on quorum sensing and biofilm formation of bacteria. *Food Sci.* 2010;31:140-143. [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTotal-SP-KX201009035.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-SP-KX201009035.htm).
63. Lu J V., Tang A V. Cellulolytic Enzymes and Antibacterial Activity of *Auricularia polytricha*. *J Food Sci.* 1986;51(3):668-669. doi:10.1111/j.1365-2621.1986.tb13907.x.
64. Ma H, Xu X, Feng L. Responses of antioxidant defenses and membrane damage to drought stress in fruit bodies of *Auricularia auricula-judae*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014;30(1):119-124. doi:10.1007/s11274-013-1416-z.
65. Mau J-L, Chao G-R, Wu K-T. Antioxidant Properties of Methanolic Extracts from Several Ear Mushrooms. *J Agric Food Chem.* 2001;49(11):5461-5467. doi:10.1021/jf010637h.
66. Nguyen TL, Chen J, Hu Y, et al. In vitro antiviral activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides. *Carbohydr Polym.* 2012;90(3):1254-1258. doi:10.1016/j.carbpol.2012.06.060.
67. Sun Y, Li T, Liu J. Structural characterization and hydroxyl radicals scavenging capacity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Auricularia polytricha*. *Carbohydr Polym.* 2010;80(2):377-380. doi:10.1016/j.carbpol.2009.11.033.
68. Zeng W-C, Zhang Z, Gao H, Jia L-R, Chen W-Y. Characterization of antioxidant polysaccharides from *Auricularia auricular* using microwave-assisted extraction. *Carbohydr Polym.* 2012;89(2):694-700. doi:10.1016/j.carbpol.2012.03.078.
69. Zhang H, Wang Z-Y, Yang L, Yang X, Wang X, Zhang Z. In Vitro Antioxidant Activities of Sulfated Derivatives of Polysaccharides Extracted from *Auricularia auricular*. *Int J Mol Sci.* 2011;12(5):3288-3302. doi:10.3390/ijms12053288.
70. Ukai S, Hara C, Kuruma I, Tanaka Y. Polysaccharides in fungi. XIV. Anti-inflammatory effect of the polysaccharides from the fruit bodies of several fungi. *J Pharmacobiodyn.* 1983;6(12):983-990. doi:10.1248/bpb1978.6.983.
71. Nguyen TL, Wang D, Hu Y, et al. Immuno-enhancing activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides. *Carbohydr Polym.* 2012;89(4):1117-1122. doi:10.1016/j.carbpol.2012.03.082.
72. Sheu F, Chien P-J, Chien A-L, Chen Y-F, Chin K-L. Isolation and characterization of an immunomodulatory protein (APP) from the Jew's Ear mushroom *Auricularia polytricha*. *Food Chem.* 2004;87(4):593-600. doi:10.1016/j.foodchem.2004.01.015.
73. Yu J, Sun R, Zhao Z, Wang Y. *Auricularia polytricha* polysaccharides induce cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer A549 cells. *Int J Biol Macromol.* 2014;68:67-71. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.04.018.
74. Reza MA, Hossain MA, Lee SJ, et al. Dichloromethane extract of the jelly ear mushroom *Auricularia auricula-judae* (higher Basidiomycetes) inhibits tumor cell growth in vitro. *Int J Med Mushrooms.* 2014;16(1):37-47. doi:10.1615/IntJMedMushr.v16.i1.40.
75. Song G, Du Q. Structure characterization and antitumor activity of an  $\alpha$ - $\beta$ -glucan polysaccharide from *Auricularia polytricha*. *Food Res Int.* 2012;45(1):381-387. doi:10.1016/j.foodres.2011.10.035.
76. Ma Z, Wang J, Zhang L, Zhang Y, Ding K. Evaluation of water soluble  $\beta$ -D-glucan from *Auricularia auricular-judae* as potential anti-tumor agent. *Carbohydr Polym.* 2010;80(3):977-983. doi:10.1016/j.carbpol.2010.01.015.
77. Ukai S, Kihō T, Hara C, et al. Antitumor Activity of various Polysaccharides isolated from *Dictyophora indusiata*, *Ganoderma japonicum*, *Cordyceps cicadae*, *Auricularia auricula-judae*, and *Auricularia* Species. *Chem Pharm Bull.* 1983;31:741-744.
78. Wu Q, Tan Z, Liu H, et al. Chemical characterization of *Auricularia auricula* polysaccharides and its pharmacological effect on heart antioxidant enzyme activities and left ventricular function in aged mice. *Int J Biol Macromol.* 2010;46(3):284-288. doi:10.1016/j.ijbiomac.2010.01.016.
79. Cheung PCK. The hypocholesterolemic effect of two edible mushrooms: *Auricularia auricula* (tree-ear) and *Tremella fuciformis* (white jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats. *Nutr Res.* 1996;16(10):1721-1725. doi:10.1016/0271-5317(96)00191-1.
80. Luo Y, Chen G, Li B, Ji B, Guo Y, Tian F. Evaluation of antioxidative and hypolipidemic properties of a novel functional diet formulation of *Auricularia auricula* and Hawthorn. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2009;10(2):215-221. doi:10.1016/j.ifset.2008.06.004.
81. Zeng F, Zhao C, Pang J, Lin Z, Huang Y, Liu B. Chemical properties of a polysaccharide purified from solid-state fermentation of *auricularia auricular* and its biological activity as a hypolipidemic agent. *J Food Sci.* 2013;78(9). doi:10.1111/1750-3841.12226.
82. Yuan Z, He P, Cui J, Takeuchi H. Hypoglycemic effect of water-soluble polysaccharide from *Auricularia auricula-judae* Quel. on genetically diabetic KK-Ay mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998;62(June 2016):1898-1903. doi:10.3177/jnsv.44.829.
83. Yoon S-J, Yu M-A, Pyun Y-R, et al. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. *Thromb Res.* 2003;112(3):151-158. doi:10.1016/j.thromres.2003.10.022.

**Recibido:** 20 de abril de 2016.

**Aprobado:** 2 de junio de 2016.



## ARTÍCULO DE REVISIÓN

## Mecanismos de invasión del esporozoito de *Plasmodium* en el mosquito vector *Anopheles*

### Mechanisms of invasion from sporozoite of *Plasmodium* into the mosquito vector *Anopheles*

Lilian M. Spencer<sup>1</sup>, Emiliana Mendoza<sup>2</sup>, Alberto Louro<sup>1</sup>

## RESUMEN

La Malaria o Paludismo es una de las enfermedades tropicales considerada un problema de salud pública a nivel mundial por la OMS. *Plasmodium* es un protozoo cuyo vector es la hembra del mosquito *Anopheles*. En este vector se cumplen dos procesos fundamentales en el ciclo de vida del parásito, como son la reproducción sexual, con la formación de un cigoto móvil llamado oocineto como producto de la fertilización entre los gametos; y la invasión del epitelio del estómago y formación del oociste. El estadio producto de esta esporogonia son los esporozoitos (reproducción asexual) que se dirigen a las glándulas salivales; y es el infectivo para el mamífero. El esporozoito es el responsable de establecer la enfermedad en su hospedador vertebrado y por lo tanto los procesos de invasión de este a las glándulas salivales del mosquito es uno de los puntos fundamentales de estudio. Nosotros presentamos una revisión acerca de los mecanismos de invasión del parásito dentro del vector mosquito y las proteínas más importantes que median este proceso. Uno de los aspectos más estudiados en las investigaciones en malaria ha sido determinar la antigenicidad de dichas proteínas en esta parte del ciclo con el fin de ser usadas en el diseño de vacunas. Entre ellas, algunas de las más estudiadas son: P230, P48/45, P28, P25, CTRP, CS, TRAP, WARP y SOAP las cuales han sido consideradas en las estrategias para inhibir el desarrollo del parásito, mejor conocidas como vacunas de bloqueo de transmisión por el vector. Por lo tanto, presentamos algunas de las estrategias en el diseño de vacunas, basado en las proteínas implicadas en los estadios desarrollados dentro del vector.

**Palabras clave:** *Plasmodium*, invasión, esporozoito, vacuna.

## ABSTRACT

Malaria is a tropical disease considered a public health problem worldwide by WHO. *Plasmodium* is a protozoan whose vector is the female *Anopheles* mosquito. This vector has two fundamental processes in the life cycle of the parasite, such as sexual reproduction, with the formation of a mobile zygote called ookinete, product of fertilization between gametes and then invade the lining of the stomach and form the oocyst. The product of this sporogonic stage are sporozoites (asexual reproduction) that target the salivary glands, which is infective for the mammal. The sporozoite is responsible for establishing the disease in the vertebrate host and therefore the processes by which this invasion of the salivary glands of the mosquito take place are one of the key points of study. We present a review of the mechanisms of invasion of the parasite within the mosquito vector and the most important proteins that mediate this process. The most studied aspect in malaria research was to determine the antigenicity of such proteins in this part of the cycle in order for them to be used in vaccine design. Including some of the most studied, they are: P230, P48 / 45, P28, P25, CTRP, CS, TRAP, WARP and SOAP, which have been considered in strategies to inhibit the development of the parasite, which is better known as blocking transmission vaccines by the vector. Therefore, we present some strategies in designing vaccines based on proteins involved in developed stages within the vector.

**Key words:** *Plasmodium*, invasion, sporozoite, vaccine.

### Introducción

La malaria o paludismo es una enfermedad infecciosa transmitida por la hembra del mosquito *Anopheles*. Cinco especies de *Plasmodium* infectan humanos, entre ellos, tres causan la enfermedad grave provocando fiebres intermitentes pero pocas veces de manera fatal, y son *Plasmodium vivax*, *P. ovale*, *P. knowlensi*, *P. malariae* y *P. falciparum*. Esta última especie es la más agresiva en relación a las manifestaciones clínicas y es

responsable de la mayoría de las muertes en humanos.<sup>1</sup> Recientemente *P. knowlensi*, un *Plasmodium* de primates, ha sido determinado como una nueva especie que es causante de la malaria en el hombre por un proceso de zoonosis.<sup>2</sup>

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año entre 300 y 500 millones de personas son infectadas por malaria a nivel mundial y se producen de 1,5 a 2,7 millones de muertes de todas las edades por año a causa de esta enfermedad.

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias de la Vida y Biotecnología. Universidad de Yachay Tech. Urcuquí, Ecuador.

<sup>2</sup> Departamento de Biología Celular, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.

**Correspondencia:** spencerlilian@gmail.com; lspencer@yachaytech.edu.ec

El 90 % de las muertes se concentra en África, afectando especialmente a niños menores de 5 años y mujeres embarazadas. Se considera que la mitad de la población mundial está en riesgo de contraer la enfermedad, abarcando principalmente áreas en África, Asia y América del Sur.<sup>3</sup>

La Oficina Panamericana de Salud (OPS) ha reportado que en las Américas se ha reducido en un 79 % la mortalidad por malaria o paludismo entre 2000 y el 2014; y solo 2 países de los 21 en América Latina siguen reportando aumentos en el número total de casos.<sup>3</sup>

El ciclo biológico de *Plasmodium* comienza en la fase sexual (esporogonia) cuando el mosquito *Anopheles* se infecta al ingerir sangre infectada de una persona que tiene los parásitos sexualmente diferenciados en gametocitos. En el estómago del mosquito los microgametocitos comienzan un proceso de exflagelación originando formas flageladas móviles (microgametos); mientras que los macrogametocitos maduran y se transforman en macrogametos que son fecundados por los microgametos originando un cigoto. El cigoto se transforma en ooquinetos (cigoto móvil). Este penetra la pared del estómago del mosquito pasando por el epitelio del estómago hasta llegar a la lámina basal; allí crece y forma un ooquiste, para luego dar origen a los esporozoitos.<sup>4,5,6</sup>

Los esporozoitos entran en la hemolinfa, en la cavidad del mosquito, hasta invadir las glándulas salivales donde permanecen hasta ser inoculados, con la saliva, en la piel del hospedador mamífero.<sup>5</sup>

En *P. vivax* y *P. ovale* se da una fase latente llamada hipnozoíto. Estos elementos son la causa de las recaídas tardías, que se presentan en infecciones por estas especies.<sup>4,6</sup>

Los merozoítos penetran en los eritrocitos formando los trofozoítos, y cuando el núcleo del trofozoíto tardío se divide en varios fragmentos (esquizogonia eritrocítica) se constituye un esquizonte. Luego de que culmina el proceso de maduración se produce la rotura del eritrocito y se liberan los merozoítos en el torrente sanguíneo. Esta fase del parásito invade de nuevo otros eritrocitos y se continúa desarrollando la esquizogonia eritrocítica.<sup>5,6,7</sup> En la Fig. 1 está representado el ciclo de vida del *Plasmodium* y su transmisión por el mosquito *Anopheles*.

La etapa de desarrollo del parásito en el hombre (esquizogonia hepática) comienza con una fase pre-eritrocítica, donde los esporozoítos pasan al torrente circulatorio después de ser inoculado por el mosquito *Anopheles*. De allí pasan a las células parenquimatosas hepáticas donde crecen y se multiplican por esquizo-

gonia (reproducción sexual) y dan lugar al esquizonte hepático o criptozoico (esquizogonia primaria exoeritrocítica). Este madura y sufre ruptura, liberando merozoítos tisulares, los cuales luego invaden los glóbulos rojos (eritrocitos).

En el mosquito vector las formas móviles (esporozoíto y ooquinetos) del parásito *Plasmodium* contienen organelos secretores especializados (micronemas) en su extremo apical (complejo apical). Estas formas y las no móviles (gametos y ooquistes) secretan una variedad de proteínas durante la fase sexual que juegan un papel importante en el proceso de fertilización, el reconocimiento de la célula hospedadora y en los distintos mecanismos de desplazamiento de dicho parásito.<sup>8,9</sup>

Las proteínas más importantes y/o estudiadas durante el proceso de invasión son: P16 y P27, expresadas principalmente durante la gametogénesis; P230 y P48/45 expresadas durante el proceso de fertilización y diferenciación del cigoto; Proteína Quinasa Dependiente de Calcio (CDPK4), P25 y P28, Quitinasa, Proteína Relacionada a TRAP y a la Circunsporozoíto (CTRP), Proteína Relacionada al dominio del factor A de Von Willebrand (WARP) y Proteína Adhesiva Secretada por Ooquistes (SOAP), que están presentes en la post-fertilización y que son importantes para el proceso de invasión por parte del ooquinetos móvil, en los tejidos que incluye el epitelio del estómago del mosquito. Luego de la formación del ooquiste, se expresan proteínas como la Proteína Circunsporozoítica (CSP), Proteína Anónima Relacionada con la Trombospondina (TRAP), Membrana Apical Antígeno/Unida al Eritrocito (MAEBL), Proteína trombospondina (TRSP) y Proteína de los micronemas del esporozoíto para el tránsito celular (SPECT), que son esenciales para la motilidad del esporozoíto y su invasión a las glándulas salivales.

Actualmente muchas investigaciones han orientado su interés en el estudio del desarrollo de *Plasmodium* en el mosquito, ya que implica interacciones significativas del parásito con las distintas células hospedadoras. Aunque todavía queda mucho por descubrir, el conocimiento actual de la biología del desarrollo esporogónico en el vector ha demostrado ser útil en el diseño de vacunas experimentales utilizando los distintos antígenos antes mencionados.<sup>10,11</sup> Por lo tanto, la identificación de dichas moléculas dianas podrían conducir al desarrollo de nuevas y eficaces vacunas de bloqueo de transmisión y de esta manera prevenir o disminuir la expansión de poblaciones de parásitos.<sup>11,12</sup>

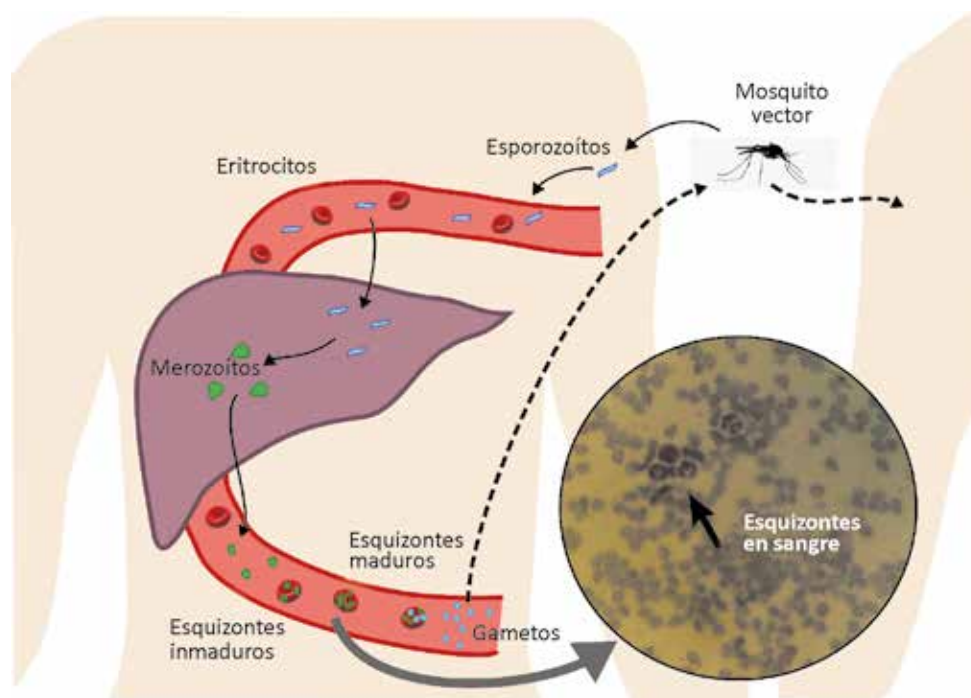


Fig. 1. Ciclo de vida de *Plasmodium* y su transmisión por el mosquito hembra *Anopheles*.

## Desarrollo de *Plasmodium* en el vector mosquito *Anopheles*

La fase sexual constituye un proceso obligado en el ciclo de vida del parásito y es requerido para su transmisión entre los dos hospedadores, vertebrado e invertebrado (mosquito). La etapa se desarrolla desde la formación de los gametocitos en la sangre del vertebrado, que son succionados por el mosquito, hasta la formación de los esporozoítos luego de que invaden las glándulas salivales, para ser inoculados de nuevo en el hospedador humano, completándose de esta manera el proceso de esporogonia.<sup>13</sup>

El desarrollo de la gametogénesis es clasificado en 5 etapas morfológicas<sup>14</sup>, establecidas como etapas I, II, III, IV y V; el inicio de la etapa I no se diferencia morfológicamente del trofozoíto asexual, el cambio distinguible ocurre al finalizar la etapa II, con la formación de una película compleja que consiste en la membrana subpelicular de la vacuola, sostenido por una matriz de microtúbulos orientados longitudinalmente que le provee estabilidad. Esta membrana desaparece en la etapa V.<sup>15,16</sup> Otras características específicas de los gametocitos es la presencia de cuerpos osmiofílicos (CO), que son organelos secretores específicos de gametocitos ubicados en el límite de dicha membrana.

Los gametocitos se diferencian en dos tipos: micro y macrogametocitos, que en el estómago del mosquito se forman 8 microgametos contra un macrogameto. El sexo de estos es establecido en el esquizonte involucrado<sup>17,18</sup>, y la proporción de género es sesgada, formándose uno masculino en relación a 5 gametocitos femeninos. Los gametocitos en etapa V son liberados en la sangre periférica<sup>19,20,21</sup> y sólo se vuelven maduros para diferenciarse en gametos y ser tomados por los mosquitos después de 2 o 3 días de circulación periférica.<sup>22,23</sup>

Cuando el mosquito *Anopheles* hembra succiona la sangre de un humano infectado, los gametocitos maduros son succionados llegando al estómago de dicho mosquito. En este punto los gametocitos reciben señales ambientales, implicando grandes cambios, para iniciar la diferenciación en gametos. En sólo 10 minutos ambos gametocitos, masculino y femenino, disgregan la membrana eritrocítica, probablemente debido a la liberación de sustancias que activan esto, quedando libres en el estómago. En este período, el macrogametocito se forma en un gameto haploide no móvil, mientras que el microgametocito replica su genoma 3 veces, pasando de haploide a octaploide<sup>24,25</sup>, y produciendo 8 flagelos, pasando por un proceso llamado exflagelación. Estos microgametos exflagelados se adhieren normalmente a eritrocitos vecinos que se encuentran en el lumen del estómago del vector, y son ocultos dentro de rosetas, formando lo que se denominan centros de exflagelación.<sup>16,26</sup>

Los factores críticos medioambientales que activan la exflagelación son: un descenso de la temperatura de aproximadamente 5 °C, que ocurre cuando el parásito pasa del hospedador vertebrado homeotérmico al mosquito vector poiquilotérmico<sup>10,27,28</sup> y un incremento de pH, probablemente mediado por la vía de bicarbonato, que cambia de 7.4, en la sangre, a 8.3 en el estómago del mosquito.<sup>10,29</sup> Además de la presencia de ácido xanturénico, molécula derivada sintetizada en el mosquito.<sup>30,31</sup> Luego de que el microgameto emerge, se separa del cuerpo residual y está libre, moviéndose en forma sinusoidal<sup>32</sup>, para encontrar un macrogametocito y que ocurra la fertilización como reproducción sexual del parásito.<sup>16</sup>

La fusión de los gametos es seguida por la meiosis, y el cigoto se convierte en tetraploide.<sup>24</sup> Durante las siguientes 24 horas, el cigoto se transforma en ooquinetos, marcando así el final de la fase sexual del *Plasmodium*.<sup>32</sup> El ooquinetos es alargado, móvil y posee un complejo apical, lo que le permite romper y atravesar el epitelio del estómago, antes de establecerse entre el epitelio y la lámina basal. Este complejo se forma por organelos secretores llamados micronemas que contienen proteínas (CTRP, WARP, CS, SOAP y TRAP), las cuales están implicadas en la motilidad, en la difusión a través del tejido y en la invasión.<sup>33</sup> El ooquinetos es considerado

un estadio clave del ciclo de vida del parásito, debido a que existe una estrategia de éxito baja para la formación del próximo estadio de ooquiste; por lo que deben desarrollarse gran número de ooquinetos para aumentar la probabilidad de éxito de la formación del ooquiste.<sup>16,34</sup>

Cuando el ooquinetos sale de la célula epitelial se enfrenta al medio ambiente del hemocele, donde el reconocimiento por los receptores inmunes pueden desencadenar un proceso de enquistamiento, rápido y efectivo en la superficie de los parásitos que están expuestos.<sup>35</sup> Los parásitos que no murieron por este proceso continúan hasta llegar a la lámina basal, donde la interacción con dicha lámina parece inhibir la motilidad "gliding" (migración). El ooquinetos inicia la transformación a una forma replicativa y trófica, llamado ooquiste.<sup>35</sup>

El ooquiste adquiere forma esférica ya que pierde el complejo apical y las capas peliculares internas.<sup>36</sup> Dentro de la diferenciación celular, el retículo endoplasmático (ER) y el aparato de Golgi se expanden significativamente. El núcleo poliploide original se divide aproximadamente una vez cada día, de tal manera que después de 12-18 días, existen de 2000 a 8000 núcleos haploides en el ooquiste. A medida que crece, este segrega una pared prominente amorfa que lo separa del epitelio estomacal y que recubre la lámina basal. El intercambio de nutrientes ocurre a través de esta pared, que supuestamente contiene abundantes proteínas trasglutaminasas.<sup>37</sup> Los defectos en la gametogénesis, fertilización, formación del ooquinetos, motilidad del ooquinetos, el proceso de atravesar la célula epitelial del vector y el desarrollo del ooquiste, lleva a una reducción en el número de ooquistes maduros. El desarrollo de dichos ooquistes dura aproximadamente de 10 a 12 días. El ooquiste es la única etapa de desarrollo del parásito que es extracelular del ciclo de vida del parásito.<sup>33</sup>

Luego de la división nuclear, el citoplasma de la célula comienza a subdividirse por la expansión del espacio cisternal del Retículo Endoplasmático, y las células hijas (los esporozoítos) se desarrollan en la superficie de la célula, pasando por un proceso previo de partición en compartimientos llamado esporoblastos. Los esporozoítos en desarrollo salen del esporoblasto en un proceso que envuelve la movilización del núcleo y otros organelos celulares en cada esporozoíto involucrado.<sup>38</sup>

Luego de que la maduración de los esporozoítos se completa, millones de estos serán liberados del ooquiste cuando este estalle, en la hemolinfa del mosquito. Aún no se sabe si el estallido del ooquiste ocurre debido a la ruptura pasiva de la pared celular o por la activa degradación mediado por el esporozoíto.<sup>35</sup>

## Migración e invasión del esporozoíto a las glándulas salivales

Los esporozoítos adquieren motilidad antes de ser liberados del ooquiste. Varias investigaciones han determinado que la motilidad de deslizamiento y la invasión de la célula hospedadora por los esporozoítos y otras etapas invasivas son impulsadas por un motor de actina-miosina situado entre la membrana plasmática del parásito y su citoesqueleto.<sup>33</sup>

Luego de la liberación de los esporozoítos en el hemocele, estos son transportados por la circulación de la hemolinfa a todos los tejidos del mosquito. Los esporozoítos en el hemocele eventualmente pasan por la lámina basal de las glándulas salivales del mosquito. Durante este encuentro los ligandos de los parásitos reconocen receptores específicos que permiten que el esporozoíto se adhiera a la lámina basal de las glándulas salivales y no a ningún otro tejido del mosquito.<sup>39</sup> Los esporozoítos adheridos rompen la lámina basal e invaden las células acinares secretoras de las glándulas salivales a través de su membrana plasmática basal.<sup>40</sup> La invasión se cree que ocurre en una membrana vacuolar de la célula hospedadora y no por la disrupción de la membrana plasmática. La existencia de esta vacuola es breve y sólo acompaña al esporozoíto a través del citoplasma de las células acinares.<sup>40</sup>



Finalmente, los esporozoítos salen de la vacuola transitoria a medida que emergen de la parte apical de la membrana plasmática de la célula acinar en el conducto de la glándula salival.<sup>40</sup> Se han identificado gran cantidad de ligandos del parásito que son necesarios para la unión inicial de los esporozoítos a las glándulas salivales.

El primer estudio que mostró patrones de migración y motilidad de esporozoítos de *P. berghei* dentro de las glándulas salivales del mosquito *in vivo*, fue el de Frischknecht y colaboradores en el 2004.<sup>41</sup>

En la Fig. 2, se muestra el desarrollo completo del parásito en el mosquito vector y las principales proteínas implicadas y consideradas de importantes en el diseño de las vacunas de bloqueo de trasmisión.

El desarrollo del ciclo de vida en el mosquito comienza cuando el mosquito hembra ingiere sangre de un vertebrado infectado de malaria. Poco después, los parásitos ingeridos en forma de gametocitos, se convierten en gametos masculinos y femeninos ocurriendo la fertilización para formar los cigotos transformándose en un ooquinetto móvil que se ubica en la membrana basal del epitelio intestinal formándose el ooquiste. Inmediato a esto, ocurre la división multinuclear, seguido de la división de membrana y la liberación de miles de esporozoítos haploides que atraviesan la matriz peritrófica del epitelio y salen a la hemolinfa. Luego estos invaden las células epiteliales de las glándulas salivales, lográndolo a través de vacuolas que se forman alrededor de los esporozoítos para atravesar la célula y así entrar a la cavidad secretoria de la glándula. Se indican las principales proteínas en los diferentes estadios de invasión que ocurren en el mosquito, las cuales son consideradas antígenos candidatos en el diseño de vacunas.

### Principales proteínas expresadas e involucradas en el desarrollo del parásito en el vector mosquito

Las primeras proteínas de la fase sexual fueron descubiertas en 1983 mediante el marcaje de la superficie de los cigotos con radioisótopos, lo que resultó en la identificación de 4 proteínas,

*Pfs25*, *Pfs41*, *Pfs48/45* y *Pfs230*.<sup>42,43,44,45,46</sup> Las proteínas *Pfs230* y *Pfs48/45* son co-expresadas en asociación con la superficie de los gametocitos, comenzando a más tardar de la etapa II de la gametogénesis, antes de que la fertilización se haya completado.<sup>47,48</sup>

Pero antes de que se expresen dichas proteínas, pertenecientes a esta superfamilia, se expresa la *Pfs16*. Esta proteína es sintetizada durante la gametocitogénesis, en gametocitos femeninos y masculinos, y se localiza en la membrana de la vacuola parasitífora de los parásitos.<sup>49,50</sup>

Por otro lado, la proteína *Pfs230* ha sido estudiada en detalle. Los gametocitos de ambos sexos (masculino y femenino) expresan una proteína precursora de 363 kDa, que posteriormente sufre proteólisis formándose una proteína de 310 kDa, que hace referencia a la *Pfs* en *P. falciparum* porque fue descrita originalmente como una proteína de 230 kDa.<sup>10</sup> Este proceso de proteólisis ocurre durante la activación de gametocitos y puede ser inhibido por un inhibidor de proteasas<sup>51,52</sup> que demuestra bloquear la exflagelación dejando al microgameto inmóvil.<sup>53</sup>

La *Pfs230* media la unión de los gametocitos masculinos emergentes a los eritrocitos durante la formación de los centros de exflagelación, siendo caracterizada como una proteína de adhesión.<sup>13,54</sup>

La proteína *Pfs48/45*, que consiste en dos polipéptidos con pesos de 48 y 45 kDa respectivamente, es expresada en la superficie de gametocitos maduros y gametos femeninos y masculinos de *P. falciparum* y *P. berghei*, siendo detectada desde el día 2 de la gametocitogénesis y en la fertilización.<sup>10</sup> La falta de la proteína *Pfs48/45* no afecta la fertilidad en gametos femeninos, sino la de los microgametos y en consecuencia, también la producción de ooquinetos y ooquistes.

También se han identificado proteínas quinasas, como la proteína quinasa dependiente de calcio (CDPK4), expresada mayormente en gametocitos masculinos y está involucrada en la señalización y regulación de la fase sexual.<sup>55</sup>

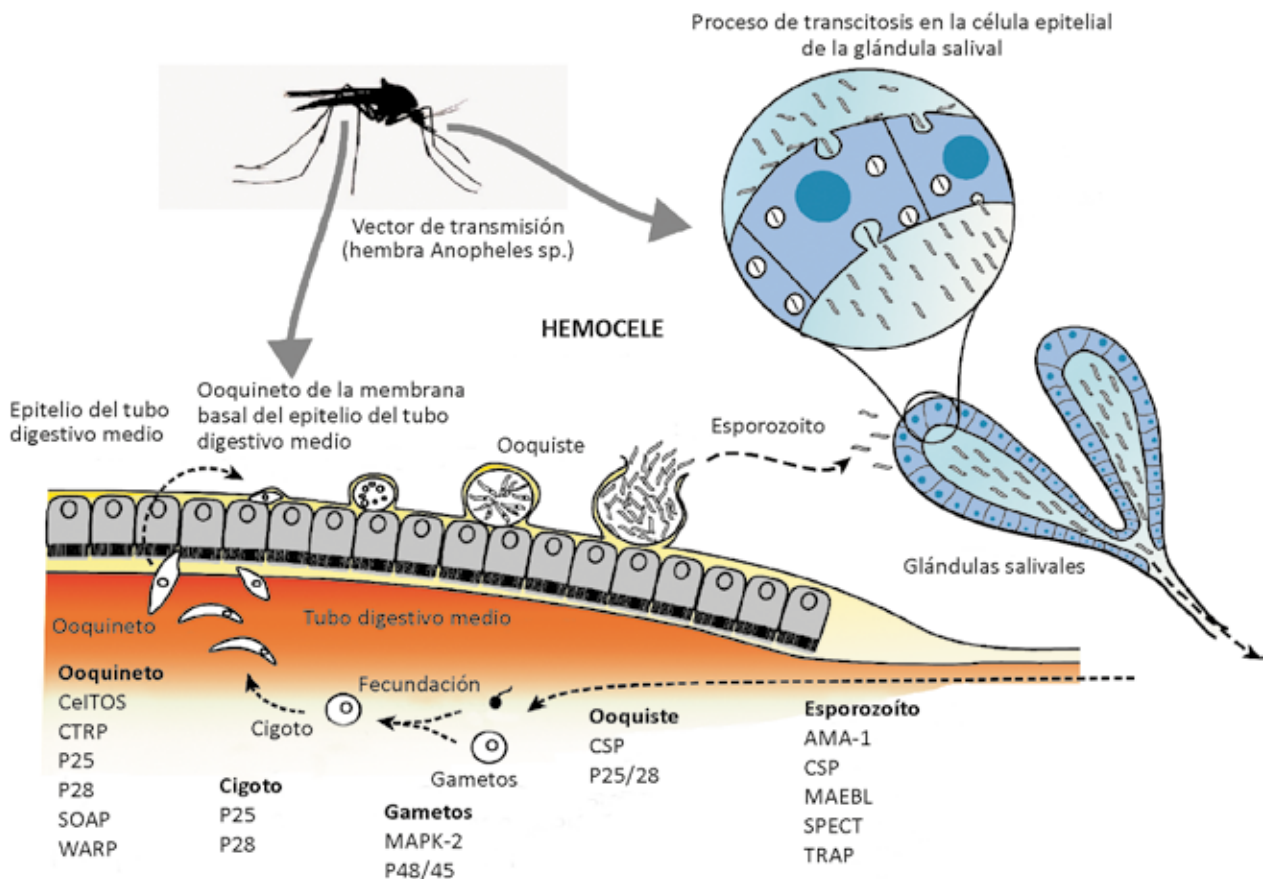


Fig. 2. Migración e invasión del *Plasmodium* en el mosquito vector.

Las P25 y P28 son las proteínas más predominantes en la superficie de cigotos, ooquistos y hasta en el ooquiste, y son muy similares entre parásitos de malaria en roedores, aves y humanos.<sup>43,56-61</sup> Ambas proteínas están adheridas a la superficie del ooquistos por el glicosil fosfatidil inositol (GPI) de anclaje<sup>62</sup>, y comparten un patrón de expresión similar, estando una adyacente a la otra en el genoma.<sup>58</sup>

También se ha observado que estas proteínas participan en la interacción de la lámina basal, mediada principalmente por la laminina, con el ooquiste. Al parecer, esta interacción induce la transformación del ooquistos móvil a un ooquiste sésil, y se cree que dicha transformación es desencadenada por las dos proteínas (P25 y P28) que se unen e interactúan con la laminina para la transformación del ooquistos.<sup>33,38</sup>

Los investigadores han caracterizado cuatro proteínas provenientes de micronemas en los ooquistos: la Quitinasa (pcth1) la cual está presente en todas las especies de *Plasmodium*, la proteína relacionada al dominio del factor A de Von Willebrand (siglas en inglés: WARP) y la proteína adhesiva secretada por ooquistos (siglas en inglés: SOAP), las cuales son proteínas solubles; mientras que la proteína relacionada a TRAP y a la circunsporozoito (siglas en inglés: CTRP) está asociada a la membrana del parásito.<sup>63</sup>

La proteína CTRP es sintetizada 10 horas luego de la fertilización, cuando el cigoto se transforma en el ooquistos. Esta proteína tiene dominios con función adhesiva entre célula-célula y célula-matriz peritrófica, por lo que juega un rol importante en la motilidad y estabilidad del ooquistos para invadir las células epiteliales del estómago.<sup>8,64</sup>

La proteína WARP es expresada en la etapa final del desarrollo del ooquistos y a principios del ooquiste<sup>65,66</sup>, y ha sido identificada en *P. berghei*, *P. falciparum* y *P. vivax*. Varios estudios han sugerido que WARP juega un rol importante en la adhesión. Durante la invasión del estómago del mosquito, esta proteína puede mediar el apego del ooquistos al estómago, y durante la diferenciación de ooquistos a ooquiste puede mediar la interacción con la membrana basal del mosquito<sup>65,66</sup>. Igualmente, está la proteína SOAP, que es expresada en la misma etapa que WARP, es principalmente requerida para la invasión del estómago y parece interactuar con la lámina basal, al igual que las proteínas P25/28 y CTRP.<sup>67,68,69</sup>

A nivel de las glándulas salivales las proteínas circunsporozoita (CS) y la anónima relacionada a trombospondina (TRAP) son dos de las más estudiadas en el parásito y consideradas en el diseño de una vacuna. Estas proteínas han sido identificadas en todas las especies de *Plasmodium*.<sup>63,70,71,72,73</sup>

La CS es una proteína de membrana anclada a GPI de 60 kDa que cubre toda la superficie del esporozoito. La expresión de esta proteína comienza a principios de la fase del ooquiste, mostrando un pico cuando el esporozoito se encuentra en las glándulas salivales. Estudios han revelado que esta proteína está involucrada principalmente en el proceso de citoquinesis durante la formación del esporozoito, en el proceso de salida del ooquiste, en la motilidad "gliding" (secretada en el polo anterior) y en la invasión del esporozoito a las glándulas salivales.<sup>5,38,63,74,75</sup> La proteína TRAP, está localizada en la superficie del esporozoito, y la expresión comienza en la etapa tardía del ooquiste, luego de que se completa la morfogénesis del esporozoito. Varios estudios han demostrado que TRAP es importante para la motilidad y la invasión de las glándulas salivales.<sup>76,77</sup>

También existen otras proteínas como MAEBL, AMA-1 y SPECT que están presentes en la superficie del esporozoito durante la invasión de las glándulas salivales pero, no parecen ser fundamentales para la invasión, atribuyéndoles funciones en otras fases del desarrollo del esporozoito (invasión del hepatocito y eritrocito).<sup>78,79</sup>

## Vacunas de bloqueo de transmisión

La inmunidad para generar el bloqueo de la transmisión para el control de la malaria fue reportado por primera vez en 1976 por Gwadz; y por Carter y Chert en *Plasmodium gallinaceum* de la malaria aviar.<sup>80,81</sup> Estudios posteriores para el bloqueo de transmisión fueron confirmando que los inmunógenos estaban presentes en la superficie de los gametos masculinos y femeninos y en los ooquistos que invaden el estómago del mosquito.<sup>82</sup>

Las vacunas de bloqueo de transmisión (VBT) están diseñadas para interrumpir la transmisión de la enfermedad y se basan en la producción de anticuerpos contra antígenos de la fase sexual del parásito y otras proteínas que se desarrollan en el mosquito, impidiendo así la infección de los mosquitos vectores.<sup>83</sup> Los anticuerpos generados por el hospedador vertebrado contra los gametocitos bloquearán la fertilización y los anticuerpos contra los ooquistos bloquearán el paso a través del estómago. Teóricamente, este tipo de vacunas podrían reducir la prevalencia de la morbilidad y mortalidad por malaria en áreas endémicas e incluso contribuir a la erradicación de esta parasitosis en áreas de baja transmisión.<sup>84,85</sup>

En este tipo de vacunas, una persona que tenga anticuerpos contra antígenos de la fase sexual no estarían protegidos contra la infección de la malaria, pero impediría que el parásito se transmitiera del mosquito al humano y luego al mosquito nuevamente. Este tipo de vacuna se considera "altruista", justamente porque la persona vacunada no se beneficia directamente ni está protegida, pero puede proteger a la comunidad circundante al disminuir la posibilidad de transmisión en el vector.<sup>86</sup>

Las principales proteínas propuestas como candidatas de VBT pueden dividirse en dos categorías: (1) Antígenos expresados en gametocitos y gametos, como la P48/45 y P230, en donde la inmunidad es impulsada naturalmente por la infección, y (2) antígenos expresados en la fase de gametos, cigotos y ooquistos en el vector mosquito, incluyendo la P25 y la P28, que nunca se manifiestan en el hospedador humano.<sup>16</sup>

También se ha demostrado que anticuerpos contra proteínas expresadas en los ooquistos, como las WARP y CTRP, tienen importante actividad bloqueadora de transmisión, sugiriendo que estas también se incluyen como candidatas para desarrollar las VBT.<sup>63,66,87</sup> Además, estas dos proteínas están presentes durante el desarrollo del parásito en el mosquito, son consideradas candidatas para vacunas preeritrocíticas. Estas proteínas que tienen alta efectividad, por proporcionar una inmunidad estéril, son consideradas como vacunas que también interrumpen la transmisión del parásito.<sup>88</sup>

Por otra parte, las proteínas CS tienen una región central repetida que genera la respuesta de anticuerpos mediante exposición natural o por vacunación.<sup>89,90</sup> Esta proteína junto con la TRAP son de gran importancia como candidatas a vacuna, por el hecho de que animales y humanos inmunizados con esporozoitos atenuados por irradiación presentaban títulos altos de anticuerpos contra estas proteínas. Sin embargo, para este efecto era necesario títulos más altos de anticuerpos.<sup>85</sup> Pero la mayoría de los ensayos de vacunas basados en estos dos antígenos, por sí solos, han dado resultados no satisfactorios.<sup>91</sup>

En los últimos años, los resultados más exitosos con las vacunas de malaria, se han obtenido al combinar antígenos provenientes diferentes etapas de desarrollo del parásito.<sup>86</sup> Una de estas es la RTS que ha sido la primera vacuna contra la malaria que ha demostrado niveles significativos de protección clínica en ensayos de campo. Esta vacuna consiste en una molécula híbrida compuesta por la región repetida de los epítomos de células T (T) de la CS junto con el antígeno de superficie de la hepatitis B (S) en forma de una matriz.<sup>88,91</sup> Sin embargo, no protege por completo (100 %), por lo que no es una vacuna ideal para erradicar la enfermedad.

Tomando en cuenta los ensayos de diseño de vacunas anti-maláricas, las VBT presentan dificultades por no alcanzar niveles óptimos de cobertura al vacunar tanto adultos, como en niños.<sup>84,88</sup>

## Conclusiones

La etapa sexual como parte del ciclo de vida de *Plasmodium* constituye un proceso clave para la sobrevivencia del parásito, ya que generará el estadio infeccioso (esporozoito) para el hospedador vertebrado y varias proteínas de superficie intervienen en la invasión del parásito en el mosquito vector, presentándose desde la pre-fertilización (P230, P48/45), pasando por la formación del cigoto y el oocineto (CDPK4, P25 y P28, Quitinasa como MAPK-2) para luego invadir el epitelio del estómago (CTRP, WARP y SOAP), formándose el ooquiste y por último los esporozoítos que invaden las glándulas salivales (CS, TRAP y SPECT). El estudio de estas proteínas es importante, ya que varias de ellas (P230, P48/45, P25 y P28) son consideradas candidatas para el desarrollo de VBT y otras para el desarrollo de vacunas pre-eritrocíticas (CS, TRAP), por ser proteínas inmunogénicas que permiten disminuir la dispersión de la malaria en zonas endémicas.

El conocimiento de las proteínas antigénicas en los diferentes estadios del parásito, tanto en el vector como en el humano, son consideradas para el desarrollo de una estrategia exitosa de una vacuna. Lo que proponen los investigadores es una vacuna multi-antigénica con proteínas provenientes de la etapa sexual, de la pre-eritrocítica y de la eritrocítica; y de esta manera lograr aminorar los niveles de la infectividad de malaria en zonas con alto riesgo de padecerla.

Otro aspecto a considerar para la lucha contra la malaria es la quimioterapia aplicada para la cura de la enfermedad. La OMS/OPS recomiendan el uso de Cloroquina como tratamiento en la mayoría de los países con infecciones con *P. vivax*. Sin embargo, para *P. falciparum* se ha reportado una alta resistencia en zonas endémicas a la cloroquina, por lo que la OMS/OPS recomienda una terapia de combinación basada en la Artemisinina, como tratamiento principal contra este parásito<sup>92</sup>.

Finalmente no debemos olvidar la profilaxis para esta enfermedad. Las medidas preventivas recomendadas son: el uso de mosquiteros impregnados con insecticida, usar ropa adecuada como pantalones largos y camisas manga larga en áreas endémicas y rociado interno residual de los insecticidas en las zonas de transmisión de malaria; para disminuir el riesgo de las picaduras de los mosquitos infectados.

## Agradecimientos

Al Decanato de Investigación de la Universidad Simón Bolívar y de Yachay Tech por facilitarnos la fuente bibliográfica.

Les pedimos disculpas a los autores que trabajan en este tema y no han sido citados por límite de espacio.

## Referencias bibliográficas

1. Knell, A. 1991. Malaria. Trustees of the Wellcome Trust. USA.
2. Singh, B., Kim Sung, L., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, SSG., CoxSingh, J., et al. 2004. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. Lancet. 363:1017-24
3. World Health Organization (2010). World Malaria Report. <http://apps.who.int/malaria/wmr2008/>. Revisado: 03/11/2012
4. Llop, A. 2001. Microbiología y Parasitología Médica. Editorial de Ciencias Médicas. Tomo III, Capítulo 88:152-167.
5. Wang, Q., Fujioka, H. y Nussenzweig, V. 2005. Exit of Plasmodium Sporozoites from Oocysts Is an Active Process That Involves the Circumsporozoite Protein. Pathol. (1): 72-79.
6. Pumarola, A. 1995. Microbiología y Parasitología Médica. 2da Edición. Editorial Salvat. Capítulo (76): 832-843.
7. Spencer L. M., Gómez, A. y Collovini E. 2016. Mecanismos de invasión del esporozoito y merozoito de Plasmodium. Bionatura 1(2): 39 – 44.
8. Dessens, J.T. y col. 1999. CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. Mol. (22): 6221-6227.
9. Sinden, R., Alavi, Y., Butcher, G., Dessens, J., Raine, J. y Trueman, H. 2004. Ookinete cell biology. In Malaria Parasites-Genomes and Molecular Biology. Caister Academic Press.
10. Hoffman, S., Miller, L. 1996. Perspectives on Malaria Vaccine Development. Vol. 8: 181-228.
11. Goodman AL, Blagborough AM, Biswas S, Wu Y, Hill AV, Sinden RE, Draper SJ. 2011. A viral vectored prime-boost immunization regime targeting the malaria Pfs25 antigen induces transmission-blocking activity. PLoS One.;6(12):e29428.
12. Herrera, S. 2005. La Malaria: Estrategias actuales para el desarrollo de una vacuna efectiva. Rev. Acad. Colomb. Cienc. (113): 535-546.
13. van Dijk, M. van Schaijk, B., Khan, S. y col. 2010. Three Members of the 6-cys Protein Family of Plasmodium Play a Role in Gamete Fertility. PLoS Pathog vol. 4.
14. Hawking F, Wilson ME, Gammage K. 1971. Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of Plasmodium falciparum. Trans R Soc Trop Med Hyg. 65(5):549-59
15. Sinden, R. 1982. Gametocytogenesis of Plasmodium falciparum in vitro: an electron microscopic study. Parasitology (84): 1-11.
16. Pradel G. 2007. Proteins of the malaria parasite sexual stages: expression, function and potential for transmission blocking strategies. Parasitology. Dec;134(Pt.14):1911-29.
17. Silvestrini F, Alano P. y Williams, L. 2000. Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Parasitology (121): 465-471.
18. Smith, T., Lourenço, P., Carter, R. y Ranford, L. 2000. Commitment to sexual differentiation in the human malaria parasite, Plasmodium falciparum. Parasitol. (121): 127-133.
19. Thomson, J. y Robertson, A. 1935. The structure and development of Plasmodium falciparum gametocytes in the internal organs and in the peripheral circulation. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (29): 31-40.
20. Smalley, M. y Brown, J. 1981. Plasmodium falciparum gametocytogenesis stimulated by lymphocytes and serum from infected Gambian children. Trop. Medic. (75): 316-317.
21. Rogers, N., Hall, B., Obiero, J. y col. 2000. A model for sequestration of the transmission stages of Plasmodium falciparum: Adhesion of gametocyte-infected erythrocytes to human bone marrow cells. Infection and Immunity (68): 3455-3462.
22. Smalley ME, Sinden RE. 1977. Plasmodium falciparum gametocytes: their longevity and infectivity. Parasitology. Feb;74(1):1-8
23. Lensen, A., Bril, A., van de Vegte, M., van Gemet, Eling, W. y Sauerwien, R. 1999. Plasmodium falciparum: infectivity of cultured, synchronized gametocytes to mosquitoes. Experimental Parasitology, (91): 101-103.
24. Janse, C., van der Klooster, P., van der Kaay, H., van der Ploeg, M. y Overdulve, P. 1986. DNA synthesis in Plasmodium berghei during asexual and sexual development. Molecular and Biochemical Parasitology, (20): 173-182.
25. Janse, C. y col. 1988. DNA synthesis in gametocytes of Plasmodium falciparum. Parasitology, (96): 1-7.
26. Templeton, T., Keister, D., Muratova, O., Lynn, J. y Kaslow, D. 1998. Adherence of erythrocytes during exflagellation of Plasmodium falciparum microgametes is dependent on erythrocyte surface sialic acid and glycoporphins. Journal of Experimental Medicine, (187): 1599-1609.
27. Billker, O., Shaw, M. K., Margos, G., y Sinden, R. E. 1997. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of Plasmodium berghei in vitro. Parasitology, (115): 1-7.
28. Beier JC, Davis JR, Vaughan JA, Noden BH, Beier MS. 1991. Quantitation of Plasmodium falciparum sporozoites transmitted in vitro by experimentally infected Anopheles gambiae and Anopheles stephensi. Am J Trop Med Hyg. May;44(5):564-70.
29. Sherwood, J. 1991. Immunogenicity and efficacy of a Plasmodium falciparum circumsporozoite vaccine in a malaria endemic area of Kenya. Trop. 287.
30. Billker, O., Lindo, V., Panico, M. y col. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito, Nature, (6673): 289-292.



31. García, G. E., Wirtz, R. A., Barr, J. R., Woolfitt, A. y Rosenbergt, R. 1998. Xanthurenic acid induces gametogenesis in *Plasmodium*, the malaria parasite. *Journal of Biological Chemistry*, (273): 12003–12005
32. Simon N, Scholz SM, Moreira CK, Templeton TJ, Kuehn A, Dude MA, Pradel G. 2009. Sexual stage adhesion proteins form multi-protein complexes in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. May 22;284(21):14537–46.
33. Aly A.S., Vaughan, A.M y Kappe, S.H.I. 2009. Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annu Rev Microbiol*. (63): 195–221.
34. Vaughan, J. A., Noden, B. H. and Beier, J. C. 1994. Sporogonic development of cultured *Plasmodium falciparum* in six species of laboratory-reared *Anopheles* mosquitoes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (51): 233–243.
35. Sinden RE. 2002. Molecular interactions between *Plasmodium* and its insect vectors. *Cell Microbiol*. Nov;4(11):713–24. Review.
36. Canning, E.U. y Sinden, R.E. 1973. The organisation of the ookinete and observations on nuclear division in the oocysts of *Plasmodium berghei*. *Parasitology* 67: 29–40.
37. Adini, A., Krugliak, M., Ginsburg, H., Li, L., Lavie, L., y Warburg, A. 2001. Transglutaminase in *Plasmodium* parasites activity and putative role in oocysts and blood stages. *Mol Biochem Parasitol* (117): 161–168.
38. Vlachou, D., Runn, E., Mendes, A. y col. 2006. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Genetics & Development*, (16): 384–391.
39. Sinden, R. y Matuschewski, K. 2005. The sporozoite. In: Sherman, IW., editor. *Molecular Approaches to Malaria*. ASM Press. p169–190.
40. Pimenta PF, Touray M, Miller L. 1994. The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary gland. *J Eukaryot Microbiol*, (41):608–24.
41. Frischknecht F1, Baldacci P, Martin B, Zimmer C, Thiberge S, Olivero-Marín JC, Shorte SL, Ménard R. 2004. Imaging movement of malaria parasites during transmission by *Anopheles* mosquitoes. *Cell Microbiol*. Jul;6(7):687–94.
42. Renner, J., Graves, P., Carter, R., Williams, J. y Burkot, T. 1983. Target antigens of transmission blocking immunity on gametes of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Experimental Medicine* (158): 976–981.
43. Vermeulen AN, Ponnudurai T, Beckers PJ, Verhave JP, Smits MA, Meuwissen JH. 1985. Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito. *J Exp Med*. Nov 1;162(5):1460–76.
44. Vermeulen, A., van Deursen, J., Brakenhoff, R., Lensen, T., Ponnudurai, T. y Meuwissen, J. 1986. Characterisation of *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens and their biosynthesis in synchronised gametocyte cultures. *Molecular and Biochemical Parasitology* (20): 155–163.
45. Quakyi, I., Carter, R., Renner, J., Kumar, N., Good, M. y Miller, L. 1987. The 230-kDa gamete surface protein of *Plasmodium falciparum* is also a target for transmission-blocking antibodies. *Journal of Immunology* (139): 4213–4217.
46. Kaslow, D., Quakyi, I., Syn, C., Raum, M., Keister, D., Coligan, J., McCutchan, T., y Miller, L. 1988. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature*, (333): 74–76.
47. Williamson, K., Criscio, M. y Kaslow, D. 1993. Cloning and expression of the gene for *Plasmodium falciparum* transmission-blocking target antigen Pfs230. *Molecular and Biochemical Parasitology* (58): 355–358.
48. Williamson, K., Keister, D., Muratova, O. y Kaslow, D. 1995. Recombinant Pfs230, a *Plasmodium falciparum* gametocyte protein, induces antisera that reduce the infectivity of *Plasmodium falciparum* to mosquitoes. *Molecular and Biochemical Parasitology* (75): 33–42.
49. Baker, D.A., Daramola, O., McCrossan, M.V., Harmer, J., Targett, G.A. 1994. Subcellular localization of Pfs16, a *Plasmodium falciparum* gametocyte antigen. *Parasitology* (108): 129–137.
50. Bruce, M.C., Carter, R.N., Nakamura, K., Aikawa, M., Carter, R., 1994. Cellular location and temporal expression of the *Plasmodium falciparum* sexual stage antigen Pfs16. *Mol. Biochem. Parasitol*, (65): 11–22.
51. Williamson, K., Fujioka, K., Aikawa, M. y Kaslow, D. 1996. Stage-specific processing of Pfs230, a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine candidate. *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 78, no. 1: 161–169.
52. Brooks, S. R. y Williamson, K. C. 2000. Proteolysis of *Plasmodium falciparum* surface antigen, Pfs230, during gametogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, (106): 77–82.
53. Rupp, I., Bosse, R., Schirmeister, T. y Pradel, G. 2008. Effect of protease inhibitors on exflagellation in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 158, no. 2: 208–212.
54. Eksi, S., Czesny, B., van Gemert, G., Sauerwein, R., Eling, W. y Williamson, K. 2006. Malaria transmission-blocking antigen, Pfs230, mediates human red blood cell binding to exflagellating male parasites and oocyst production. *Molecular Microbiology*, vol. 61, no. 4, pp. 991–998.
55. Billker, O., Dechamps, S., Tewari, R., Wenig, G., Franke-Fayard, B., Brinkmann, V. 2004. Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell*, (117): 503–514.
56. Kumar N, Carter R. 1985. Biosynthesis of two stage-specific membrane proteins during transformation of *Plasmodium gallinaceum* zygotes into ookinetes. *Mol Biochem Parasitol*. Feb;14(2):127–39.
57. Paton MG, Barker GC, Matsuoka H, Ramesar J, Janse CJ, Waters AP, Sinden RE. 1993. Structure and expression of a post-transcriptionally regulated malaria gene encoding a surface protein from the sexual stages of *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol*. Jun;59(2):263–75.
58. Duffy, P. E. and Kaslow, D. C. (1997). A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as falciparum malaria transmission-blocking vaccines. *Infection and Immunity* 65, 1109–1113.
59. Tsuboi T, Kaslow DC, Cao YM, Shiwaku K, Torii M. 1997. Comparison of *Plasmodium yoelii* ookinete surface antigens with human and avian malaria parasite homologues reveals two highly conserved regions. *Mol Biochem Parasitol*. Jul;87(1):107–11.
60. Tsuboi T1, Kaslow DC, Gozar MM, Tachibana M, Cao YM, Torii M. 1998. Sequence polymorphism in two novel *Plasmodium vivax* ookinete surface proteins, Pvs25 and Pvs28, that are malaria transmission-blocking vaccine candidates. *Mol Med*. Dec;4(12):772–82.
61. Tachibana M, Tsuboi T, Templeton TJ, Kaneko O, Torii M. 2001. Presence of three distinct ookinete surface protein genes, Pos25, Pos28-1, and Pos28-2, in *Plasmodium ovale*. *Mol Biochem Parasitol*. Apr 6;113(2):341–4.
62. Shahabuddin, M. 1998. *Plasmodium* ookinete development in the mosquito midgut: a case of reciprocal manipulation. *Parasitology*, (116): S83–S93.
63. Moreira CK, Marrelli MT, Jacobs-Lorena M. 2004. Gene expression in *Plasmodium*: from gametocytes to sporozoites. *Int J Parasitol*. Dec;34(13–14):1431–40. Review.
64. Yuda, M., Sakaida, H. y Chinzei, Y. 1999. Targeted disruption of the *Plasmodium berghei* CTRP gene reveals its essential role in malaria infection of the vector mosquito. *Journal of Experimental Med*. (190): 1711–1716.
65. Yuda, M., Yano, K., Tsuboi, T., Torii, M. y Chinzei, Y. 2001. Von Willebrand Factor a domain-related protein, a novel microneme protein of the malaria ookinete highly conserved throughout *Plasmodium* parasites. *Mol. Biochem. Parasitol*. (116): 65–72.
66. Abraham, E.G., Islam, S., Srinivasan, P., Ghosh, A.K., Valenzuela, J.G., Ribeiro, J.M., Kafatos, F.C., Dimopoulos, G., Jacobs-Lorena, M. 2004. Analysis of the *Plasmodium* and *Anopheles* transcriptional repertoire during ookinetes development and midgut invasion. *J. Biol. Chem*. 279, 5573–5580.
67. Adini A, Warburg A. 1999. Interaction of *Plasmodium gallinaceum* ookinetes and oocysts with extracellular matrix proteins. *Parasitology* (4):331–36.
68. Vlachou D, Lycett G, Siden-Kiamos I, Blass C, Sinden RE, Louis C. 2001. *Anopheles gambiae* laminin interacts with the P25 surface protein of *Plasmodium berghei* ookinetes. *Mol Biochem Parasitol*, 112:229.
69. Arrighi RB, Hurd H. 2002. The role of *Plasmodium berghei* ookinete proteins in binding to basal lamina components and transformation into oocysts. *Int J Parasitol*. Jan;32(1):91–8.
70. Nussenzweig V, Nussenzweig RS. 1985. Malaria vaccine against sporozoites? *Ann Inst Pasteur Immunol*. Nov-Dec;136D(3):301–12.

71. Müller HM, Reckmann I, Hollingdale MR, Bujard H, Robson KJ, Crisanti A. 1993. Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* binds specifically to sulfated glycoconjugates and to HepG2 hepatoma cells suggesting a role for this molecule in sporozoite invasion of hepatocytes. *EMBO J.* Jul;12(7):2881-9.
72. Robson KJ, Frevert U, Reckmann I, Cowan G, Beier J, Scragg IG, Takehara K, Bishop DH, Pradel G, Sinden R, et al. 1995. Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum*: expression during sporozoite ontogeny and binding to human hepatocytes. *EMBO J.* Aug 15;14(16):3883-94.
73. Sultan, A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K.J., Crisanti, A., Nussenzweig, V. y Nussenzweig, R. 1997. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. *Cell* 90, 511-522.
74. Kappe, S., Buscaglia, C. y Nussenzweig, V. 2004. *Plasmodium* sporozoite molecular cell biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* (20):29-59.
75. Menard, R., Sultan, A., Cortes, C., Altszuler, R., van Dijk, M., Janse, C., Waters, A., Nussenzweig, R., y Nussenzweig, V. 1997. Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes. *Nature*, (385): 336-340.
76. Wengelnik K, Spaccapelo R, Naitza S, Robson KJ, Janse CJ, Bistoni F, Waters AP, Crisanti A. 1999. The A-domain and the thrombospondin-related motif of *Plasmodium falciparum* TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. *EMBO J.* Oct 1;18(19):5195-204.
77. Ghosh A. K. and Jacobs-Lorena M. 2009. Plasmodium sporozoite invasion of the mosquito salivary gland. *Curr Opin Microbiol.* 12(4): 394-400.
78. Kariu T1, Yuda M, Yano K, Chinzei Y. 2002. MAEBL is essential for malarial sporozoite infection of the mosquito salivary gland. *J Exp Med.* May 20;195(10):1317-23.
79. Srinivasan P, Abraham EG, Ghosh AK, Valenzuela J, Ribeiro JM, Dimopoulos G, Kafatos FC, Adams JH, Fujioka H, Jacobs-Lorena M. 2004. Analysis of the *Plasmodium* and *Anopheles* transcriptomes during oocyst differentiation. *J Biol Chem.* Feb 13;279(7):5581-7. Epub 2003 Nov 19.
80. Gwadz, R. W. 1976. Malaria: successful immunization against the sexual stages of *Plasmodium gallinaceum*. *Science* (Wash. DC). (193):1150.
81. Carter, R. y Chert, D. H. 1976. Malaria transmission blocked by immunization with gametes of the malaria parasite. *Nature* (Lond.). (293): 57.
82. Arakawa T, Tsuboi T, Sattabongkot J, Sakao K, Torii M, Miyata T. 2014. Tricomponent complex loaded with a mosquito-stage antigen of the malaria parasite induces potent transmission-blocking immunity. *Clin Vaccine Immunol.* Apr;21(4):561-9.
83. Stowers AW, Keister DB, Muratova O, Kaslow DC. 2000. A region of *Plasmodium falciparum* antigen Pfs25 that is the target of highly potent transmission-blocking antibodies. *Infect Immun.* Oct;68(10):5530-8.
84. Carter, R., Mendis, KN., Miller, L. H., Molineaux, L. y Saul, A. 2000. Malaria transmission-blocking vaccines--how can their development be supported? *Nat Med*, (6): 241-244.
85. Patarroyo ME, Cifuentes G, Rodríguez R. 2008. Structural characterisation of sporozoite components for a multistage, multi-epitope, anti-malarial vaccine. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(3):543-57.
86. Carvalho LJ, Daniel-Ribeiro CT, Goto H. 2002. Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects. *Scand J Immunol.* Oct;56(4):327-43.
87. Li F, Templeton TJ, Popov V, Comer JE, Tsuboi T, Torii M, Vinetz JM. 2004. *Plasmodium* ookinete-secreted proteins secreted through a common micronemal pathway are targets of blocking malaria transmission. *J Biol Chem.* Jun 18;279(25):26635-44.
88. Moorthy VS, Ballou WR. 2009. Immunological mechanisms underlying protection mediated by RTS,S: a review of the available data. *Malar J.* Dec 30;8:312.
89. Ballou WR, Rothbard J, Wirtz RA, Gordon DM, Williams JS, Gore RW, Schneider I, Hollingdale MR, Beaudoin RL, Maloy WL, et al. 1985. Immunogenicity of synthetic peptides from circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Science.* May 24;228(4702):996-9.
90. Matuschewski K. 2006. Vaccine development against malaria. *Curr Opin Immunol.* Aug;18(4):449-57.
91. Greenwood, B., Targett, G. 2009. Do we still need a malaria vaccine?. *Parasit. Immunol.* (31): 582-586.
92. OPS OMS | Paludismo [Internet]. [citado el 22 de mayo de 2016]. Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=33&Itemid=40757&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=33&Itemid=40757&lang=es)

**Recibido:** 17 de junio de 2016.

**Aprobado:** 20 de julio de 2016.

## NEWS AND VIEWS

## El volcán Chimborazo "El Coloso de los Andes"

### The Volcano Chimborazo "The Colossus of the Andes"

Dario Felix Castro Izurieta

Yachay Tech University, Urcuqui. Ecuador

#### RESUMEN

Por muchos años se pensó que el Monte Everest localizado en Nepal podía ser considerado como el punto más alto del mundo en todo sentido; sin embargo, un estudio realizado por el Instituto Geográfico Militar del Ecuador (IGM) con ayuda del Instituto Francés de Investigación para el Desarrollo (IRD), el cual consistió en realizar nuevas mediciones considerando el centro de la Tierra como referencia, arrojaron que el volcán Chimborazo es el punto más alto del planeta superando al Everest por un margen de alrededor de dos kilómetros. Gracias a estos nuevos datos relevantes, el volcán Chimborazo ha hecho eco alrededor del mundo siendo un atractivo para científicos y curiosos en general interesados en saber un poco más sobre la geología y la biología del lugar.

**Palabras clave:** Chimborazo, Everest, planeta, monte, volcán.

#### ABSTRACTS

For many years it was thought that the Mount Everest located in Nepal could be considered to be the highest point of the world in any sense; nevertheless, a study realized by the Military Geographical Institute of the Ecuador (IGM) with help of the French Institute of Investigation for the Development (IRD) which consisted of realizing new measurements considering the center of the Earth to be a reference throwing that the volcano Chimborazo is the highest point of the planet overcoming the Everest for a margin of about two kilometers. Thanks to this new excellent information, the volcano Chimborazo has done echo about the world being an attraction for scientific and curious in general been interesting in knowing a little more on the geology and the local biology.

**Key words:** Chimborazo, Everest, planet, mount, volcano.

#### Introducción

El volcán Chimborazo está ubicado en la provincia que lleva su nombre a unos 150 kilómetros al sur de Quito, capital de Ecuador, posee una altura desde el nivel del mar de 6268 metros, dándole así la categoría de ser el Volcán más alto de la Cordillera Real. Se estima que la última erupción de este coloso se dio entre el siglo V y el siglo VII y en un análisis de promedio, por estudios de las últimas erupciones, existe un intervalo de tiempo eruptivo de mil años, siendo considerado un volcán potencialmente activo y un riesgo para las zonas pobladas alrededor de este como Riobamba y Ambato<sup>1</sup>. 8 (Fig.1)

Para la conmemoración de los 280 años de la primera misión geodésica al volcán, la cual consistió en una delegación de científicos de la Academia de Ciencias de París que tenían como objetivo completar datos para determinar la forma de la Tierra<sup>9</sup>, se organizó un ascenso a la cumbre del Chimborazo donde se realizó la medición mediante el sistema global de navegación por satélite siendo sus siglas en inglés GNSS en la cual se logró determinar que este volcán es el punto más alejado del centro de la Tierra con un radio de 6384,4 kilómetros y con una precisión de más - menos tres metros, siendo este valor mayor a los registrados por el volcán Huascarán de Perú y el Monte Everest de Nepal adjudicándose el título del pico más alto con respecto al centro de la Tierra<sup>2</sup>. (Fig .2)



**Fig. 1.** Vicuña (*Vicugna vicugna*) or vicugna is wild South American camelid, which live in the high alpine areas of the Andes. It is a relative of the llama. It is understood that the Inca valued vicuñas for their wool. The vicuña is the national animal of Ecuador, Peru and Bolivia. The photo was taken on the road through the Andes near the inactive stratovolcano Chimborazo, in the Cordillera Occidental of the Andes. Photo taken on: August 06th, 2012 © Xura | Dreamstime.com -

Esta diferencia de altura entre el volcán Chimborazo y el Monte Everest se debe a la forma de la tierra puesto que en la región ecuatorial se ensancha aumentando su radio, siendo así esta zona la más cerca al espacio. Por esta razón el Chimborazo presenta una diferencia de 1.8 kilómetros en relación al Everest proclamándose así el punto más alejado del centro de la Tierra; sin embargo, si se realiza la medición desde el nivel del mar el Monte Everest sigue siendo la cumbre más alta del planeta<sup>3</sup>.



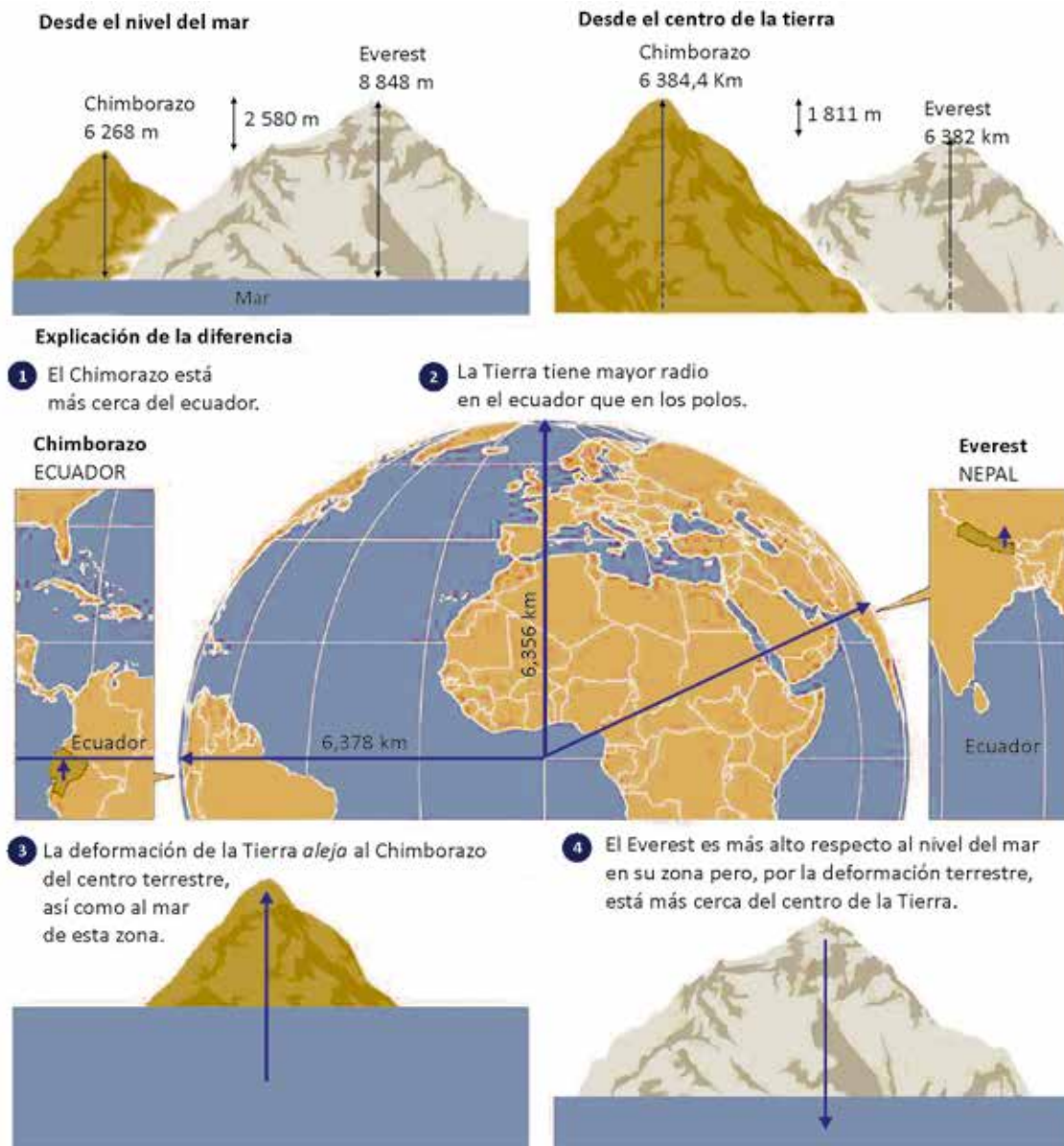


Fig. 2. Imagen comparativa entre el Monte Everest y el Chimborazo. (Longás, H. (10.04.2016). El volcán Chimborazo le quita un récord al Everest. El País, Ecuador.

Fuente: Instituto Geográfico Militar de Ecuador. HEBER LONGÁS/El PAÍS. Disponible desde: [http://elpais.com/elpais/2016/04/06/ciencia/1459968044\\_919086.html](http://elpais.com/elpais/2016/04/06/ciencia/1459968044_919086.html)

El volcán Chimborazo es un relevante casquete glaciar que se encuentra conformado por una cúpula somital que es una estructura con forma de domo que se proyecta hacia arriba desde el cuerpo principal y 16 lenguas glaciares (forman parte del glaciar, pero discurren por gravedad a lo largo de un valle)<sup>10</sup> sin embargo, en estas últimas décadas se ha podido observar una regresión del glaciar generando un impacto negativo ambiental sobre diferentes poblaciones del sector<sup>4</sup>.

Los deshielos de estos glaciares han permitido la observación y reconocimiento de estructuras volcánicas que antes permanecían ocultas, hecho que ha despertado el interés de nuevos estudios geológicos en el lugar. El agua proveniente de estos deshielos son el inicio de importantes sistemas fluviales como el río Mocha, el río Chimborazo y el río Ambato que son afluentes del río Pastaza que se dirige hasta el Amazonas<sup>4</sup>.

En este volcán tenemos la Reserva de Producción Faunística Chimborazo creada el 26 de octubre de 1987, esta reserva se encuentra compartida por las provincias de Chimborazo, Bolívar y Tungurahua teniendo una extensión total de 58560 hectáreas

con una altura que varía desde los 3800 a los 6310 metros sobre el nivel del mar. Tiene como objetivo preponderar los ecosistemas dominantes como el páramo y la puna, además de precautelar el desarrollo del hábitat de los camélidos endémicos como es el caso de la vicuña, la llama y la alpaca que son consideradas especies ligadas a la identidad cultural de la zona<sup>5</sup>.

Dentro del ecosistema que encierra esta gran reserva ecológica se destaca su relativa aridez que actúa atrapando la humedad proveniente de los vientos occidentales, siendo un lugar con muy poca presencia de precipitaciones, por lo tanto el suelo actúa como una esponja facilitando acumulación del agua y permitiendo el crecimiento de una gran diversidad de plantas herbáceas autóctonas del páramo como es el caso de la paja de paramo (*Stipa ichu*), ñachag (*Bidens andicola*), chuquiragua o flor del andinista (*Chuquiraga jussieui*), las orejas de conejo (*Stachys lanata*), el romerillo (*Hipericum laricifolium*), el sunfo (*Clinopodium nubigenum* Kuntze) y el ashpachocho (*Lupinus pubescens*); también, existen árboles como el kishwuar (*Buddleja incana*) y árboles de papel (*Polylepis*) que se encuentran formando pequeños bosques<sup>6</sup>.

Dentro de la flora de tipo herbácea podemos resaltar a la cola de caballo (*Equisetum arvense*) que posee propiedades hepatoprotectoras por la escisión del metanol (MeOH) resultando en aislamiento de dos resinas fenólicas (*Phenolic petrosins*) y cuatro flavonoides, de los cuales es necesario dar mención al phenolic petrosin Onitin y al flavonoide Luteolin ya que estos muestran la característica de hepatoprotección en la actividad citotóxica generada por la tacrina en células hepáticas G2. El análisis EC<sub>50</sub> (concentración media efectiva) que se emplea comúnmente para determinar concentraciones de toxinas o drogas que causan un efecto en el cuerpo, arrojó un resultado positivo para el uso de esta planta para el tratamiento de la hepatitis en la medicina oriental tradicional<sup>7</sup>. (Fig.3)



**Fig. 3.** Equisetum arvense The morning dew, nature. Photo taken on: May 09th, 2015. © Janmiko1 | Dreamstime.com

El parque también presenta una gran diversidad de especies de animales entre los cuales tenemos a mamíferos, aves, anfibios y reptiles. Entre los mamíferos encontramos a las llamas (*Lama glama*), alpacas (*Vicugna pacos*) y vicuñas (*Vicugna vicugna*) cuyo hábitat natural es el páramo, también podemos encontrar a los venados (*Odocoileus peruvianus*), chucuris (*Mustela frenata*), lobos de páramo (*Pseudalopex culpaeus*), conejos (*Sylvilagus brasiliensis*), pumas (*Puma concolor*) y zarigüeyas andinas (*Didelphis pernigra*), dentro de las aves tenemos la presencia de cóndores (*Vultur gryphus*) (Fig.4), curiquingues (*Phalco boenus carunculatus*), gavi-lanes, ligles, tangaras montana enmascarada (*Buthraupis wetmorei*) y colibríes donde se resalta el colibrí estrellita del Chimborazo (*Oreotrochilus Chimborazo*), dentro de los anfibios están las ranas marsupiales (*Gastrotheca riobambae*) y las ranas cutín y por ultimo dentro de los reptiles están las guagsas (*Stenocercus guentheri*) y lagartijas completando así la fauna de la reserva<sup>6</sup>.

Conforme a la información brindada por el Ministerio del Ambiente del Ecuador la vicuña como especie endémica se encuentra ligada a las culturas andinas hasta su desaparición debido a la conquista española, para la recuperación de esta especie se firmó un convenio con países andinos vecinos con el fin de la conservación y manejo de la vicuña. El páramo del Chimborazo posee las mejores condiciones climáticas y ecológicas para la reintroducción de esta especie que inició mediante donaciones dentro del marco del acuerdo firmado. Las donaciones fueron por parte de países vecinos andinos como son Chile, Perú y Bolivia sumando un total de 277 ejemplares que a la fecha del último estudio poblacional realizado en el mes de julio de 2012 existe un total de 4824 ejemplares, siendo un éxito la reinserción de esta especie endémica del lugar.



**Fig. 4.** Andean condor (*Vultur gryphus*) against sunset sky background. Photo taken on: March 03rd, 2012. © Jackf | Dreamstime.com -

## Conclusiones

Con la última misión geodésica la cual tuvo lugar del 2 al 6 de febrero de 2016<sup>8</sup> a la cumbre del Chimborazo se ha roto una hegemonía existente con el paso de los años como era el título otorgado al Monte Everest del punto más lejano de la superficie terrestre. El volcán Chimborazo no solamente es destacado por su altura, en este último tiempo se ha visto un aumento en el interés de estudiar y comprender aspectos que encierra la belleza de este símbolo nacional, como es el caso de su geología y la biodiversidad que ha tomado como hogar las laderas de este impresionante volcán.

## Referencias bibliográficas

1. Instituto Geofísico de la Escuela Politécnica Nacional, (S.F). *Chimborazo*. Extraído desde: <http://www.igepn.edu.ec/chimborazo>
2. Comando Conjunto de las Fuerzas Armadas del Ecuador, (2016).
3. Krulwich, R. (2016). *The 'Highest' Spot on Earth?*. Krulwich Wonder. Extraído desde: <http://www.npr.org/templates/story/story.php?storyId=9428163>
4. Barba, D. (2006). *Estudio vulcanológico del complejo volcánico Chimborazo-Ecuador*. Tesis Ingeniería Geológica. Extraído desde: <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/144>
5. Ministerio del Ambiente del Ecuador. (S.F). *Reserva de Producción de Fauna Chimborazo, 26 años de protección*. Extraído desde: <http://www.ambiente.gob.ec/reserva-de-produccion-de-fauna-chimborazo-26-anos-de-proteccion/>
6. Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador. (2015). *Reserva de Producción de Fauna Chimborazo*. Extraído desde: <http://areasprotegidas.ambiente.gob.ec/es/areas-protegidas/reserva-de-produccion-de-fauna-chimborazo>
7. Oh, H., Kim, D. H., Cho, J. H., & Kim, Y. C. (2004). Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. *Journal of Ethnopharmacology*, 95(2), 421-424.
8. Embajada francesa en Ecuador. (2016). *La Tercera Misión Geodésica francesa en Ecuador – 2016*. Extraído desde: <http://www.ambafrance-ec.org/La-Tercera-Mision-Geodesica-francesa-en-Ecuador-2016>
9. Avilés, E. (S.F). *Misión Geodésica Francesa*. Enciclopedia del Ecuador. Extraído desde: <http://www.encyclopediadelecuador.com/historia-del-ecuador/mision-geodesica-francesa/>
10. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. (2010). *Glosario de Geología*. Extraído desde: [http://www.ugr.es/~agcasco/personal/rac\\_geologia/rac.htm](http://www.ugr.es/~agcasco/personal/rac_geologia/rac.htm)

**Recibido:** Agosto de 2016.

**Aprobado:** Septiembre de 2016.

Corresponding author: E.mail . [dario.castro@yachaytech.edu.ec](mailto:dario.castro@yachaytech.edu.ec)



