

# Bionatura

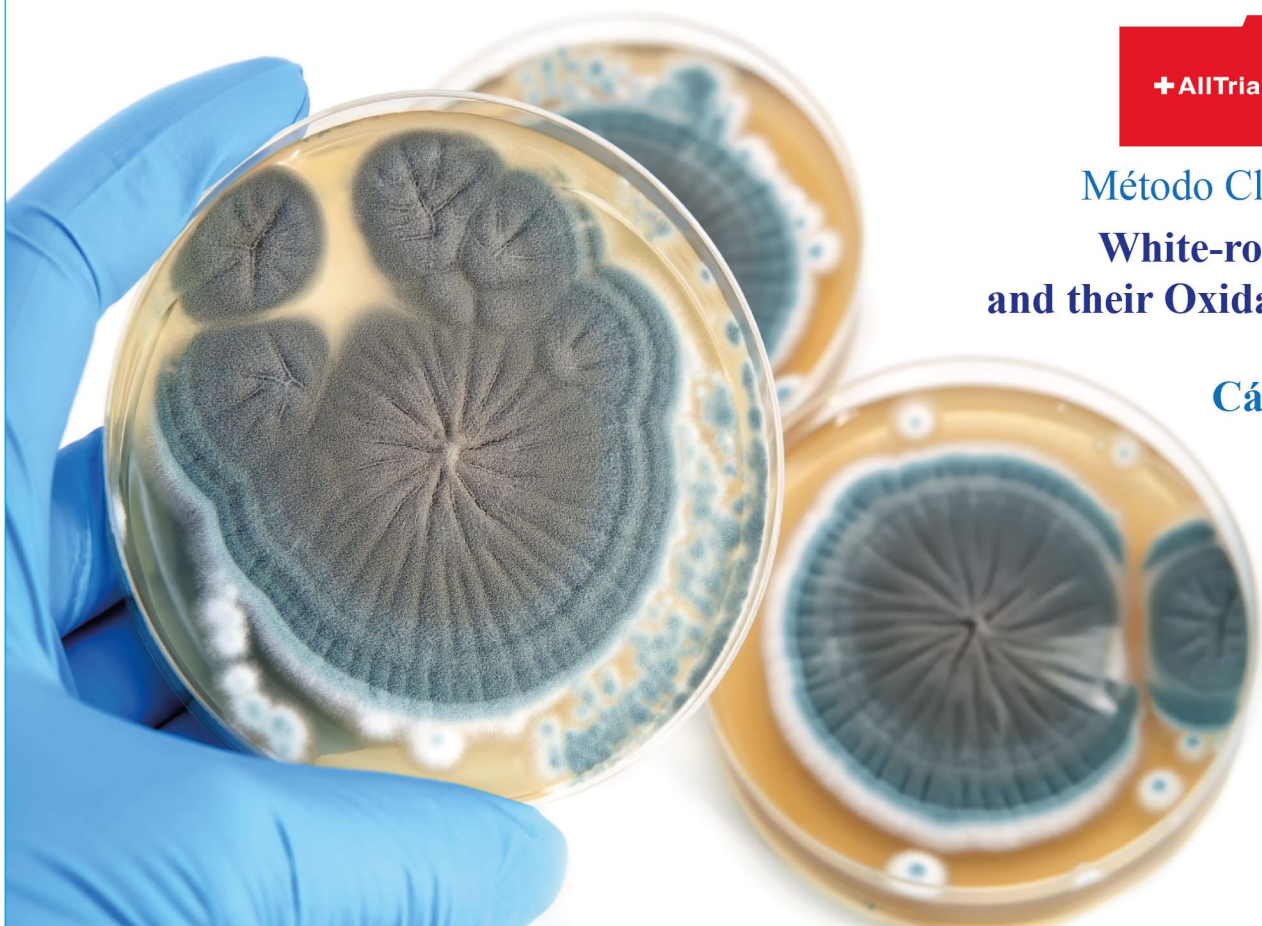
Hidden clinical trials harm patients  
– but a powerful coalition is fighting for change

+ AllTrials

Método Clínico

**White-rot Fungi  
and their Oxidative Enzymes**

Cáncer de pulmón



**Bacteriófagos como antibióticos naturales**

*Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*

Vacuna contra *Streptococcus pneumoniae*

*Espeletia pycnophylla*, el ángel del norte



Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente



# Docencia, investigación, extensión y proyección social al servicio del territorio



## Fortalezas institucionales

- > Biotecnología
- > Limnología
- > Derechos Humanos – Posconflicto
- > Internacionalización
- > Inclusión Social
  - SER – Servicio Educativo Rural
  - Educación de Alfabetización
- > MIES – Instituto de formación para el trabajo y el desarrollo humano
- > Formación humanística “Ruta Humanística en el currículo - Cátedra abierta Madre de la Sabiduría”
- > Investigación y desarrollo tecnológico
- > Comprometida con la calidad
- > Centro de Estudios Territoriales
- > Biodiversidad
  - Herbario
  - Ictiología
  - Litoteca

## Áreas del conocimiento

- Ciencias Agropecuarias
  - Ciencias de la Educación
  - Ciencias de la Salud
  - Ciencias Económicas y Administrativas
  - Ciencias Sociales
  - Derecho
  - Ingenierías
  - Teología y Humanidades
- > 26 programas de pregrado
  - > 16 programas de posgrado
    - 1 doctorado
    - 8 maestrías
    - 7 especializaciones

[www.uco.edu.co](http://www.uco.edu.co)  [universidad.catolicadeoriente](https://www.facebook.com/universidad.catolicadeoriente)  [@uconiano](https://twitter.com/uconiano)



“Servicio educativo con calidad en:  
Personas, procesos y servicios”

**Contacto institucional Universidad Católica de Oriente**  
Sector 3, Cra. 46 No. 40B 50 - **PBX:** +(57)(4) 569 90 90. Ext. 694  
**Fax:** +(57)(4) 531 39 72 - **Email:** [uco@uco.edu.co](mailto:uco@uco.edu.co)





# Bionatura



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

## Equipo editorial

### Editor General / Editorial Manager

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

### Editor Jefe / Chief Editor

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

### Consejo Editorial / Editorial Board

- Dr. Spiros N. Agathos, Ph.D. Full Professor and Dean, School of Life Sciences and Biotechnology Yachay Tech University, Ecuador.
- Dr. Gerardo Ferbeyre. Full Professor. Département de biochimie. Faculté de Médecine. Université de Montréal, Canadá.
- Dra. Luciana Dente. Full Professor. Universidad de Pisa, Italia.
- Dr. Eduardo López Collazo. Director IdiPAZ Institute of Biomedical Research, La Paz Hospital, España.
- Dr. Manuel Limonta. Prof. PhD. Director: Regional Office for Latin American and the Caribbean International Council for Science (ICSU).
- Dr. Amit Chandra, MD, MSC, FACEP Global Health Specialist, Emergency Physician Millennium Challenge Corporation, London School of Economics and Political Science.
- Dr. Aminael Sánchez Rodríguez. PhD. Director del departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Técnica Particular de Loja
- Dra. Thelvia I. Ramos Gómez. MD, Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Ecuador.
- Dr. Oliberto Sánchez. Profesor Asociado. Universidad de Concepción, Chile.
- Dr. Jorge Roberto Toledo. Profesor Asociado. Universidad de Concepción, Chile.
- Dra. Daynet Sosa del Castillo. PhD. Directora del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador. CIBE-ESPOL
- Dr. Dagoberto Castro Restrepo. PhD. Profesor / Investigador. Director Investigación y Desarrollo. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia
- Dra. Hortensia María Rodríguez Cabrera. PhD. Profesora Investigadora. Universidad de Yachay Tech, Ecuador.
- Dra. Lilian Spencer. PhD. Profesora Investigadora. Universidad de Yachay Tech, Ecuador.
- Dra. Consuelo Macías Abraham. Directora del Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), de La Habana, Cuba.
- Dr. René Delgado. PhD. IFAL / Presidente Sociedad Cubana de Farmacología. Cuba
- Dr. Ramón Guimil. Senior Director. Oligonucleotide Chemistry bei Synthetic Genomics, Estados Unidos.
- Dra. Vivian Morera. Directora de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Universidad de las Américas, Ecuador.
- Dr. Eduardo Penton. MD, PhD, Investigador Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba
- Dr. Luis Trujillo. Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Ecuador.
- Dra. Celia Fernandez Ortega. Investigadora Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba.
- Dra. Lisset Hermida. Investigadora Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba
- Dra. Marbel Torres Arias. Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Ecuador.
- Dr. Rachid Seqqat. Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Ecuador.
- Dra. Ligia Isabel Ayala Navarrete. Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Ecuador.
- Dr. Tirso Pons. Staff Scientist. Structural Biology and Biocomputing Programme (CNIO), España.
- Dra. Maritza Pupo. Profesora investigadora. Facultad de Biología. Universidad de la Habana, Cuba.
- Dr. Fidel Ovidio Castro. Founder, Profesor investigador. Tecelvet, Chile.
- Dra. Olga Moreno. Partner, Head Patent Division. Jarry IP SpA, Chile.
- Dr. Che Serguera. French Institute of Health and Medical Research. MIRcen, CEA, Fontenay-aux-Roses Paris, France
- Dr. Carlos Borroto. Asesor de Transferecia de Tecnología. Dirección General at Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY), México.
- Dr. Javier Menéndez. Manager Specialist Process and Product 5cP. Sanofi Pasteur, Canadá.
- Dr. Fran Camacho. PHD Researcher. Universidad de Concepción, Chile
- Dr. Pedro Valiente. Profesor investigador. Facultad de Biología. Universidad de la Habana, Cuba.
- Dr. Diógenes Infante. Prometeo / SENESCYT. Especialista de primer nivel en Biotecnología. Universidad de Yachay Tech, Ecuador.
- Dra. María Elena Fleitas Mesa. Profesora Investigador. Universidad de las Américas, Ecuador.
- Dra. Georgina Michelena. Profesora Investigador. Organización de las Naciones Unidas. (ONU), Suiza.
- Dr. Francisco Barona. Profesor Asociado. Langebio Institute, México
- Dr. Gustavo de la Riva. Profesor Investigador Titular. Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, México.
- Dr. Manuel Mansur. New Product Introduction Scientist (NPI) at Elanco Animal Health Ireland, Irlanda.
- Dr. José Manuel Pais Chanfrau. Universidad Técnica del Norte, Ecuador.
- Dr. Reynerio Álvarez. Prometeo / SENESCYT. Especialista de primer nivel en Biotecnología. Universidad Central del Ecuador, Ecuador
- Dra. Ileana Rosado Ruiz-Apodaca. Profesor / Investigador. Universidad de Guayaquil, Ecuador.
- Dr. Carlos Eduardo Giraldo Sánchez. PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia
- MsC. Nubia Yineth Velásquez Velásquez. Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia
- Dr. Mario Alberto Quijano Abril. PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia
- Dr. Samir Julián Calvo Cardona. PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia
- Dra. Felipe Rojas Rodas. PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia
- Dra. Isabel Cristina Zapata Vahos, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia
- Dr. Felipe Rafael Garcés Fiallos, PhD, Profesor / Investigador. Vicerrectorado de Investigación, Gestión Social del Conocimiento y Posgrado Universidad de Guayaquil (UG), Ecuador
- Dr. Julio Raúl Fernández Massó, PhD, Investigador Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba

### Redacción y Edición / Copyediting and corrections

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

Diseño y Realización gráfica / Graphic design and production  
DI. José Manuel Oubiña González.

## Instrucciones para los Autores

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nuestros contactos deben ser dirigidos a:  
**Revista Bionatura: editor@revistabionatura.com**  
ISSN: 1390-9347 (Versión impresa)  
Formato: 21 x 29,7 cm  
ISSN: 1390-9355 (Versión electrónica)  
Sitio web: <http://www.revistabionatura.com>

Publicación periódica trimestral  
Esta revista utiliza el sistema peer review para la evaluación de los manuscritos enviados.  
**Instrucciones a los autores en:**  
<http://revistabionatura.com/instrucciones.html>  
**Asistente de publicación / Publication assistant**  
Evelyn Padilla Rodriguez ([sales@revistabionatura.com](mailto:sales@revistabionatura.com))

# BIONAT

## ÍNDICE / INDEX

### EDITORIAL

- Bacteriófagos como antibióticos naturales** 223  
*Bacteriophages as natural antibiotics*  
*Nelson Santiago Vispo*

### CARTA AL EDITOR

- Hidden clinical trials harm patients – but a powerful coalition is fighting for change** 226  
*Los ensayos clínicos ocultos perjudican a los pacientes - pero una poderosa coalición lucha por el cambio*  
*Sile Lane*

### INVESTIGACIÓN

- Evaluación de CIMAvaxEGF para el tratamiento del cáncer de pulmón: meta-análisis de ensayos clínicos controlados** 229  
*Evaluation of CIMAvaxEGF for the treatment of lung cancer: meta-analysis of controlled clinical trials*  
*Carmen Viada, Javier Quintero, Javier Ballesteros, Martha Fors, Mayté Robaina, Bárbara Wilkinson, Mabel Alvarez, Aliuska Frías, Elia Neninger, Camilo Rodríguez, Tania Crombet*
- Evaluación de las condiciones de cultivo de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* a nivel de laboratorio, con inulina como fuente de carbono** 235  
*Evaluation of culture conditions of *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* on laboratory scale, with inulin as carbon source*  
*James M, Velastegui E, Cruz M.A*
- Identificación y cuantificación de *Salmonella* sp. y ADNr 16S bacteriano mediante PCR en tiempo real en muestras de alimento** 241  
*Identification and quantification of *Salmonella* sp. and bacterial DNAr 16S by Real-Time PCR in food samples*  
*Viviana Chiluisa-Utreras, Andrea Echeverría*
- Elaboration of a bioprepared with probiotic effect from a mixed culture of lactic bacteria and yeasts** 245  
*Elaboración de un biopreparado con efecto probiótico a partir de un cultivo mixto de bacterias lácticas y levaduras*  
*Miranda Yuquilema J.E., Marin Cárdenas A, Baño Ayala D*



## ARTÍCULO DE REVISIÓN

**Identidad de la vacuna contra *Streptococcus pneumoniae* "Quimi-Vio" mediante la técnica Dot Blot empleando los anticuerpos monoclonales contra los polisacáridos capsulares 1,5, 6B, 14 y 19F de la bacteria**

248

*Identity of the "Quimi-Vio" *Streptococcus pneumoniae* vaccine using the Dot Blot technique using monoclonal antibodies against the capsular polysaccharides 1,5, 6B, 14 and 19F of the bacterium*

*Elizabeth González Aznar, Rubén Adonis Cabrera Arias, Fidel Ramírez Bencomo, Abel Roscoe Fajardo Sánchez y Reinaldo Acevedo Groguez*

**El método Clínico: Perspectivas actuales**

255

*The Clinical Method: Current Perspectives*

*Adonis Frómeta Guerra, Sandra Amalia Sánchez Figueredo, Mónica Alejandra Maya Castro, Jaime Jara Lalama, Diego Vladimir Valarezo Sevilla*

***The Impact of Endocrine Disrupting Chemicals on the Environmental and their Potential Biotransformation by White-rot Fungi and their Oxidative Enzymes***

263

*El impacto de los compuestos disruptores endocrinos sobre el medio ambiente y su potencial biotransformación por hongos de pudrición blanca y sus enzimas oxidativas*

*Lilian Roberto Taboada-Puig1, Maria Teresa Moreira, Spiros N. Agathos, Juan M. Lema*

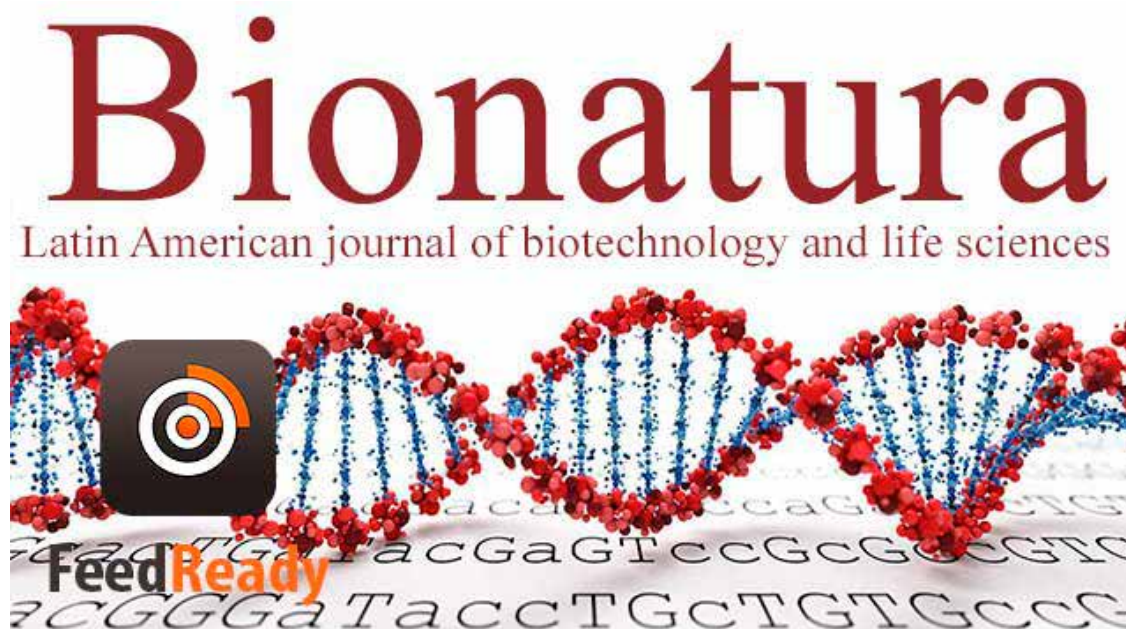
## NEWS AND VIEWS

**Espeletia pycnophylla subsp. angelensis, el ángel del norte**

272

*Espeletia pycnophylla subsp. angelensis, the angel of the north*

*Rodríguez Rebeca, Tigmasa Nahomy, García Katherine, Pazmiño Rubén y Caamaño Renzo*



Descargue la APP Feed Ready (<http://feedready.com/en/index.html>) en su móvil y tablet y mantengase al tanto de las ultimas publicaciones de la Revista Bionatura RSS, agregando <http://revistabionatura.com>

EDITORIAL

## Bacteriófagos como antibióticos naturales

### Bacteriophages as natural antibiotics

Nelson Santiago Vispo

DOI. 10.21931/RB/2017.02.01.1

**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.

Existen billones de virus en nuestro planeta, muchos de ellos juegan un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos globales infectando bacterias, archaea y microeucariotas. Entre el total de poblaciones virales los bacteriófagos, popularmente conocidos como fagos, son los que infectan bacterias y han demostrado a lo largo de la historia su actividad antibacteriana<sup>1,2</sup>.

El rápido aumento de la resistencia a los antibióticos por varios grupos de bacterias patógenas ha elevado el creciente interés por desarrollar tratamientos alternativos para contrarrestar estas infecciones<sup>3</sup>. El uso mundial de antibióticos también se ha asociado con la reducción de la diversidad microbiológica, que a su vez se ha relacionado con la desnutrición y otros tipos de enfermedades<sup>4</sup>. Para evitar el retorno a una era pre-antibiótica, los tratamientos alternativos son urgentemente necesarios. La terapia con bacteriófagos es aceptada y practicada en parte de Europa del Este, como Rusia, Georgia y Polonia. Sin embargo, todavía queda por llegar a un acuerdo en el resto del mundo sobre un marco jurídico, funcional y práctico que sea lo suficientemente flexible como para explotar más la especificidad de los bacteriófagos como antibacterianos manteniendo la seguridad del paciente.

A pesar del largo historial de uso de la terapia fágica en los países del este de Europa, el proceso de producción de los fagos debe satisfacer normas mínimas de calidad y seguridad antes de poder ser utilizados en aplicaciones clínicas. Se debe promover la disponibilidad de grandes colecciones de fagos terapéuticos importantes, bien caracterizados y sus cepas huésped bacterianas, como una forma eficiente de diseñar cócteles de fagos seguros y ajustarlos rápidamente a las necesidades de los pacientes.

Existe una clara necesidad de ensayos clínicos bien diseñados que demuestren seguridad y eficacia para su aplicación en humanos. En estos ensayos al no tener comparador, la evidencia científica solo podría ser contra el grupo placebo para resolver el debate sobre la eficacia de esta terapia. Idealmente, estos ensayos deben tener la capacidad de convencer al público en general y alertar a los tomadores de decisiones sobre los beneficios potenciales de la misma.

Phagoburn es un proyecto europeo de investigación y desarrollo (I+D) financiado por la Comisión Europea en el marco del Séptimo Programa Marco de Investigación y Desarrollo. El proyecto fue lanzado el 1 de junio de 2013 y durará 45 meses. Su objetivo es evaluar la terapia con fagos para el tratamiento de quemaduras infectadas con bacterias *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Esta evaluación se está llevando a cabo actualmente a través de la implementación de un ensayo clínico fase I-II. Pha-

goburn recomienda el establecimiento de un estudio de terapia con fagos para el tratamiento de heridas severas por quemaduras infectadas con patógenos nosocomiales importantes (bacterias ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter Baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*). El estudio propuesto se basa en el ya realizado ensayo clínico PhagoBurn FP7, que se centra en el tratamiento de pacientes con heridas por quemaduras infectadas con *Escherichia coli* y *P. aeruginosa*<sup>5</sup>.

Los ensayos clínicos en humanos no muestran efectos adversos del uso de la terapia con fagos. En la siguiente etapa, la eficacia de esta terapia necesita ser apoyada por más datos clínicos. Los resultados positivos, como la prevención de la disentería de *Shigella*<sup>6</sup> y el tratamiento de la otitis externa de *Pseudomonas*<sup>7</sup>, deben ser confirmados de forma independiente y hay que incluir otras infecciones humanas en estos ensayos.

La instalación de sistemas de monitoreo en la implementación inicial de la terapia con fagos, sería de mucha importancia. Esto permitiría la recopilación de metadatos para los análisis prospectivos y la evaluación de la eficacia de cócteles de fagos continuamente adaptados en el tratamiento de patógenos existentes y emergentes

La mayoría de los estudios clínicos con bacteriófagos usan suspensiones de fagos simples y no estudian los efectos y aceptabilidad farmacéutica de su composición. Además, el lapso de tiempo de la mayoría de los estudios preliminares de estabilidad de estas formulaciones, es demasiado corto en el contexto de la expectativa de vida útil farmacéutica. Las preparaciones de fago eran estables cuando los títulos no mostraban una caída significativa después de unos pocos días, mientras que otros estudios evaluaron la estabilidad durante muchos años. La comparación de los diferentes estudios indica que la estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento depende del fago y que el procedimiento debe optimizarse por separado para cada uno en específico<sup>8</sup>. Las partículas fágicas son muy versátiles, por lo que es poco probable que las estrategias de estabilización se apliquen a todos por igual. Está claro que los fagos pueden estabilizarse usando estrategias aplicadas a formulaciones proteicas, pero se necesita más investigación para conseguir formulaciones óptimas y mejorar la vida útil a largo plazo de futuros fármacos fágicos<sup>9</sup>.

Aparte de la discusión sobre la aplicación terapéutica de fagos, la producción y aplicación de cócteles de los mismos, para descontaminar los ambientes hospitalarios, es otra oportunidad que podría ser explorada. Un estudio previo realizado por el Instituto Eliava mostró que la descontaminación con fagos del ambiente hospitalario resultó en una menor incidencia de infecciones nosocomiales. Dado que el público en general y los políticos ya son conscientes de las consecuencias de las infecciones hospitalarias con "superbacterias" resistentes a los antibióticos,

esperamos que los ensayos de terapia con fagos multi-objetivo sirvan de trampolín para la aceptación y re-implementación de este proceder<sup>10</sup>.

La terapia con fagos ha recibido aprobación reglamentaria para la protección de los alimentos<sup>11</sup>, y para la protección fitosanitaria en el campo<sup>12</sup>. Los obstáculos reglamentarios en estas áreas podrían haber motivado a las pequeñas empresas biotecnológicas a buscar soluciones comerciales. Por lo tanto, la terapia con fagos podría convertirse en un enfoque aceptado en el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas en animales de granja, donde se ha logrado progreso para infecciones por *E. coli*, *Salmonella* y *Campylobacter* en aves de corral<sup>13,14</sup>.

En resumen, aunque la terapia con fagos ciertamente no es todavía una respuesta a la crisis de resistencia a los antibióticos, hay buenas indicaciones de que puede funcionar bajo condiciones específicas.

## Referencias bibliográficas

1. Vispo, N. S., & Puchades, Y. (2001). Bacteriophages: From phage therapy to combinatorial biology | Bacteriophages: De la terapia con fagos a la biología combinatoria. *Biotecnología Aplicada*, 18(3).
2. Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R. K., & Vairale, M. G. (2016). Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia Microbiologica*, (October), 1–39. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0471-x>
3. Vispo, N. S., Camacho, F., Antúnez, M. P., Toledo, R., & Ramos, O. S. (2016). Display technology on filamentous phage in the search for anti-infective biological agents. *Bionatura*. <https://doi.org/10.21931/RB/2016.01.01.6>
4. Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489, 220–230. doi:10.1038/nature11550
5. Alavidze, Z., Aminov, R., Betts, A., Bardiau, M., Bretaudeau, L., Caplin, J., Chanishvili, N., et al. (2016). Silk route to the acceptance and re-implementation of bacteriophage therapy. *Biotechnology Journal*, 11(5), 595-600. Wiley-VCH Verlag.
6. Anpilov, L. I., & Prokudin, A. A. (1984). Preventive effectiveness of dried polyvalent Shigella bacteriophage in organized collective farms. *Voenno-meditsinskii zhurnal*, (5), 39-40.
7. Wright, A., Hawkins, C. H., Ånggård, E. E., & Harper, D. R. (2009). A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clinical otolaryngology*, 34(4), 349-357.
8. Merabishvili M, Vervaeck C, Pirnay JP, De Vos D, Verbeken G, et al. (2013). Stability of *Staphylococcus aureus* phage ISP after freeze-drying (lyophilization). *PLOS ONE* 8:e68797
9. Zierdt CH. 1959. Preservation of staphylococcal bacteriophage by means of lyophilization. *Am.J.Clin. Pathol.* 31:326–31
10. Zueva, L. P., Aslanov, B. I., & Akimkin, V. G. (2013). Contemporary view on the role of bacteriophages in evolution of nosocomial strains and prophylaxis of healthcare associated infections. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*, (3), 100-107.
11. Endersen L, O'Mahony J, Hill C, Ross RP, McAuliffe O, Coffey A. 2014. Phage therapy in the food industry. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 5:327–49
12. Jones JB, Vallad GE, Iriarte FB, Obradović A, Wernsing MH, et al. 2012. Considerations for using bacteriophages for plant disease control. *Bacteriophage* 2:208–14
13. Tsonos J, Vandenheuvel D, Briens Y, De Greve H, Hernalsteens JP, Lavigne R. (2014). Hurdles in bacteriophage therapy: deconstructing the parameters. *Vet. Microbiol.* 171:460–69
14. Johnson RP, Gyles CL, Huff WE, Ojha S, Huff GR, et al. (2008). Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. *Anim. Health Res. Rev.* 9:201–15





ESCUELA DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS  
E INGENIERÍA



[www.yachaytech.edu.ec](http://www.yachaytech.edu.ec)



## CARTA AL EDITOR

### Hidden clinical trials harm patients – but a powerful coalition is fighting for change

### Los ensayos clínicos ocultos perjudican a los pacientes – pero una poderosa coalición lucha por el cambio

Sile Lane

DOI. 10.21931/RB/2017.02.01.2

Clinical trials are at the heart of modern medical research. They are the best way we have of testing whether a medicine is safe and effective. Around the world every year pharmaceutical companies, universities, government research institutes and charities fund and run tens of thousands of trials.

However, the results of around half of all clinical trials currently remain hidden. We don't know what was done and what was found out in thousands of trials on medicines we use today. There is no complete list of all clinical trials, so we do not even know that some trials have taken place, never mind what was found in them. As a result, a huge amount of medical research goes to waste. Potentially valuable findings are lost, researchers unknowingly duplicate each other's work, and gaps in knowledge are hard to identify. This has a direct impact on doctors' and patients' abilities to make informed choices about treatment options. Doctors can't be sure that they are prescribing the best medicines for their patients and aren't in fact doing harm.

Here's an example. A heart drug called Lorcinide was tested in trials in the 1980s. The results of the trials showed that the people in the trial who were taking Lorcinide were far more likely to die than those not taking it. But those results weren't published. Not until ten years later. In those ten years, doctors continued to give patients medicines like Lorcinide and it is estimated that 100,000 people in the US died as a result.

There is a human cost to non-publication of trial results too. Usually a few hundred people take part in trials but big trials can involve more than 1,000 people. These people are patients in the main. They volunteer knowing that it may or may not help them personally — but they volunteer thinking that it will benefit people like them in the future. When the findings they helped are not

Los ensayos clínicos son el fundamento de la investigación médica moderna. Constituyen la mejor forma existente de analizar si un medicamento es seguro y eficaz. En todo el mundo, cada año, empresas farmacéuticas, universidades, institutos de investigación gubernamentales y fundaciones financian y realizan decenas de miles de ensayos.

No obstante, actualmente los resultados de alrededor de la mitad de todos los ensayos clínicos se mantienen ocultos. Desconocemos los hallazgos de miles de ensayos sobre fármacos utilizados hoy en día. No existe una lista completa de todos los ensayos clínicos, por lo que no sabemos ni tan siquiera de la realización de algunos ensayos, independientemente de lo que averiguaran. En consecuencia, enormes cantidades de investigaciones médicas se desperdician. Se pierden hallazgos posiblemente valiosos, los investigadores duplican inconscientemente el trabajo de otros y resulta difícil identificar las brechas en el conocimiento. Esta situación tiene repercusiones directas sobre la capacidad de médicos y pacientes de tomar decisiones informadas sobre las opciones de tratamiento. Los médicos no pueden estar seguros de si están prescribiendo el mejor fármaco para sus pacientes o de si, por el contrario, están dañándole.

Un ejemplo. En los años ochenta se estudió un fármaco para el corazón llamado lorcainida. Los resultados de los ensayos mostraban que los participantes que tomaban lorcainida tenían muchas más probabilidades de morir que aquellos que no lo tomaban. Pero estos resultados no se publicaron. Tardaron diez años en hacerlo. En esos diez años, los médicos continuaron prescribiendo a sus pacientes fármacos como lorcainida y se calcula que 100 000 personas murieron en EE. UU. a consecuencia de ello.

El no publicar resultados de ensayos también tiene un coste humano. A menudo unos cuantos cientos de personas participan



shared with doctors and researchers, that is an enormous betrayal of their trust. So, if thousands of trials have never published results, that's hundreds of thousands, maybe millions, of volunteers whose trust is betrayed.

In order to fix the problem, the AllTrials campaign calls for all clinical trials – past, present and future – to be registered and their methods and results reported. Registration with a trial register like ClinicalTrials.gov ensures that researchers everywhere can find out what trials have been conducted on a given drug or disease. Posting results on the same register ensures that the discoveries made during a trial are not lost – even if that trial was discontinued or ended in failure, in which case its results are unlikely to be published in academic journals. Sharing the full methods ensures that independent researchers can review the work done by their peers and build on their findings.

To date, over 700 patient groups and professional organisations, including the American Medical Association, have joined AllTrials and added their voices to the campaign. Working together, this broad coalition has begun to turn the tide. Rising awareness of the immense human and financial cost of hidden trials has spurred governments, regulators, research institutions and professional bodies into action. Pharmaceutical giant GlaxoSmithKline joined AllTrials and committed to greater clinical trial transparency. The International Committee of Medical Journal Editors has announced that it will no longer publish papers based on non-registered trials. In the UK, anyone planning to run a clinical trial must commit to registering it in order to receive ethics approval. Laws and regulations in the European Union, the United States and beyond are consistently evolving towards mandating greater clinical trial transparency. In September 2016, the United Nations called on governments worldwide to pass legislation requiring clinical trials to be registered, and their methods and results to be fully reported.

AllTrials is currently stepping up its efforts to build on this incredible momentum and to make some permanent changes to clinical trial reporting. We have published a roadmap to transparency showing how and where individuals and organisations can bring pressure for change. The roadmap clearly spells out what doctors, researchers, universities, patient groups, and professional associations around the globe can do to help ensure that all trials are registered and reported. To reach broader audiences, I went to Madrid to give a TEDx talk about AllTrials that has already been viewed over 10,000 times.

This year, will publish a major study of global pharmaceutical companies' trial registration and reporting policies. The study is expected to receive broad media coverage worldwide and has already had positive results, with several companies pledging to revise their policies in the near future. Over the course of 2017, AllTrials and the hundreds of organisations who are part of the campaign will use new tools like OpenTrials and TrialsTracker to identify specific trials that have never posted results and help get them reported. We have exciting plans that could change clinical trial reporting forever. Join us.

Readers curious about the AllTrials campaign can visit its Spanish language website at <http://www.alltrials.net/espanol/>.



Los lectores interesados en la campaña AllTrials pueden visitar el sitio web en español en <http://www.alltrials.net/espanol/>.

en ensayos, pero los ensayos grandes pueden implicar a más de mil participantes. Estas personas son pacientes en su mayoría. Se ofrecen voluntariamente sabiendo que podría o no beneficiarles personalmente, pero que ayudará a personas en sus situaciones en el futuro. Cuando esos hallazgos a los que contribuyeron no se comparten con médicos e investigadores, se produce una enorme traición a su confianza. Por lo tanto, si existen miles de ensayos que nunca han publicado resultados, existen cientos de miles, tal vez millones, de voluntarios cuya confianza ha sido traicionada.

Con el fin de poder arreglar el problema, la campaña AllTrials hace un llamamiento a registrar todos los ensayos clínicos (pasados, presentes y futuros) e informar sus métodos y resultados. Registrar un ensayo en un registro como ClinicalTrials.gov asegura que los investigadores de todo el mundo puedan averiguar qué ensayos se han realizado sobre un fármaco o enfermedad concretos. Publicar los resultados en el mismo registro garantiza que los descubrimientos hechos durante el ensayo no se pierdan, incluso si el ensayo se interrumpió o fue un fracaso, en cuyo caso es poco probable que sus resultados se publiquen en revistas académicas. Compartir la metodología completa asegura que investigadores independientes puedan revisar el trabajo realizado y construir sobre estos hallazgos.

Más de 700 organizaciones de pacientes y profesionales, incluyendo la American Medical Association, se han unido a AllTrials y han sumado sus voces a la campaña. Mediante un trabajo conjunto, esta amplia coalición ha comenzado a cambiar la situación. La concienciación sobre el inmenso coste humano y económico que esconden los ensayos ocultos ha obligado a gobiernos, legisladores, centros de investigación y organizaciones profesionales a tomar medidas. El gigante farmacéutico GlaxoSmithKline se unió a AllTrials y se comprometió a una mayor transparencia en sus ensayos clínicos. El Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas ha anunciado que no publicará más artículos sobre ensayos no registrados. En Reino Unido, cualquiera que quiera realizar un ensayo clínico debe registrarlo para poder recibir la autorización de un comité de ética. Las leyes de la Unión Europea, EE. UU. y otros países están evolucionando de forma consistente para exigir mayor transparencia en los ensayos clínicos. En septiembre de 2016, la Organización de Naciones Unidas hizo un llamamiento a los gobiernos de todo el mundo a aprobar leyes que obliguen a registrar los ensayos clínicos y a publicar al completo sus métodos y resultados.

En estos momentos, AllTrials está aumentando sus esfuerzos para construir sobre este increíble impulso y llevar a cabo cambios permanentes en el informe de ensayos clínicos. Hemos publicado una hoja de ruta hacia la transparencia que muestra cómo y dónde pueden presionar para el cambio personas individuales y organizaciones. La hoja de ruta claramente establece de forma clara qué pueden hacer médicos, investigadores, universidades, grupos de pacientes y asociaciones profesionales de todo el mundo para ayudar a garantizar el registro e informe de todos los ensayos clínicos. Para llegar a un público más amplio, me desplazé a Madrid para dar una charla TEDx sobre AllTrials que ya tiene más de 10 000 reproducciones.

Este año, será publicado un importante estudio sobre las políticas de registro e informe de ensayos de empresas farmacéuticas internacionales. Se espera que el estudio reciba cobertura mediática en todo el mundo y de resultados positivos, como el compromiso de varias farmacéuticas de revisar su política en un futuro próximo. A lo largo de 2017, AllTrials y cientos de organizaciones que forman parte de la campaña utilizarán herramientas como OpenTrials y TrialsTracker para identificar ensayos específicos que nunca han publicado resultados y ayudarles a hacerlo. Tenemos planes emocionantes que podrían cambiar el informe de ensayos clínicos para siempre. Únete a nosotros.

## INVESTIGACIÓN

## Evaluación de CIMAvaxEGF para el tratamiento del cáncer de pulmón: meta-análisis de ensayos clínicos controlados.

### Evaluation of CIMAvaxEGF for the treatment of lung cancer: meta-analysis of controlled clinical trials.

Carmen Viada<sup>1</sup>, Javier Quintero<sup>2</sup>, Javier Ballesteros<sup>3</sup>, Martha Fors<sup>4</sup>, Mayteé Robaina<sup>5</sup>, Bárbara Wilkinson<sup>1</sup>, Mabel Alvarez<sup>1</sup>, Aliuska Frías<sup>1</sup>, Elia Neninger<sup>6</sup>, Camilo Rodríguez<sup>1</sup>, Tania Crombet<sup>1</sup>.

DOI. 10.21931/RB/2017.02.01.3

## RESUMEN

CIMAvaxEGF es una vacuna terapéutica contra el cáncer enteramente desarrollada en Cuba y licenciada en el país para su uso en pacientes adultos con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) en etapas IIIB/IV. El objetivo de este trabajo es determinar la efectividad de la vacuna del CIMAvaxEGF a través de la técnica de meta-análisis combinado. Se efectuó una búsqueda en PubMed de "CIMAvaxEGF", "vacuna", se obtuvieron 20 artículos publicados por autores cubanos entre el 1 de enero de 1995 y el 30 de septiembre del 2015, donde se describen los resultados de los estudios clínicos realizados durante el desarrollo de CIMAvaxEGF, principalmente los publicados por investigadores cubanos en revistas científicas internacionales arbitradas. Los artículos describen doce ensayos clínicos realizados en Cuba de 1995–2015 con CIMAvaxEGF; cinco Fase I con 135 pacientes, un Fase II con 80 pacientes, dos Fase III con 520 pacientes, un Fase IV con 513 pacientes, un estudio observacional con 378 pacientes y dos estudios promovidos por el investigador con 35 pacientes. De estos estudios fueron seleccionados por la escala de Jadad los tres ensayos controlados. El meta-análisis consistió en la construcción del gráfico de Forest Plot, el análisis de sensibilidad y el análisis acumulado. El meta-análisis arroja resultados favorables a la vacuna CIMAvaxEGF, con heterogeneidad moderada (59,4%). El análisis de sensibilidad revela que el ensayo que más difiere de los demás es el EC056 Fase II. El análisis acumulativo indica que el resultado es conocido después del segundo ensayo.

**Palabras clave:** Factor de crecimiento epidérmico, receptor del EGF, cáncer de pulmón de células no pequeñas, tratamiento vacunal, inmunoterapia, vacunas oncológicas.

## ABSTRACT

CIMAvaxEGF is a therapeutic cancer vaccine developed in Cuba and fully licensed in the country for use in adult patients with lung cancer non-small cell (NSCLC) in stage IIIB / IV. The objective of this work is to determine the effectiveness of the CIMAvaxEGF vaccine through the combined meta-analysis technique. A PubMed search of "CIMAvaxEGF", "vaccine", 20 articles were published by Cuban authors between January 1, 1995 and September 30, 2015, describing the results of the clinical studies performed. During the development of CIMAvaxEGF, mainly those published by Cuban researchers in refereed international scientific journals. Twelve articles describe clinical trials in Cuba from 1995-2015 with CIMAvaxEGF; five Phase I with 135 patients, Phase II with 80 patients, two Phase III with 520 patients, 513 patients with Stage IV, an observational study with 378 patients and two studies sponsored by the investigator with 35 patients. These studies were selected by the Jadad scale the three controlled trials. The meta-analysis consisted of the construction of graph Forest Plot, sensitivity analysis and analysis accumulated. The meta-analysis shows favorable results to CIMAvaxEGF vaccine, with moderate heterogeneity (59.4%). The sensitivity analysis reveals that the test differs from most others is the EC056 Phase II. The cumulative analysis indicates that the result is known after the second trials.

**Keywords:** Epidermal growth factor, EGF receptor, of non-small cell lung cancer vaccine therapy, immunotherapy, oncology vaccines.

### Introducción

En Cuba, el cáncer es la segunda causa principal de muerte y la primera causa de años de vida potencialmente perdidos, lo cual ocasiona un impacto significativo en la esperanza de vida al nacer. El cáncer de pulmón es la enfermedad maligna de mayor incidencia y además la causa principal de muerte por cáncer en el país. En los años 2005–2007, se reportó anualmente un promedio de 4234 nuevos casos de cáncer de pulmón y

4601 muertes por la enfermedad, para una tasa cruda de mortalidad de 54,3 en hombres y 27,3 en mujeres por 100 000 habitantes.

Si persisten las tendencias demográficas actuales y los factores de riesgo, se puede esperar que la incidencia y la mortalidad por cáncer de pulmón aumenten significativamente en los próximos cinco años.<sup>1</sup>

Considerando que el aumento de la incidencia y la mortalidad por cáncer es un serio problema para la salud pública, el Ministerio de Salud Pública de Cuba

<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:** carmen@cim.sld.cu



ha implementado un Programa Integral de Control del Cáncer (PICC), que opera a todos los niveles del sistema nacional de salud. Este programa constituye un nuevo enfoque terapéutico para la enfermedad, donde la biotecnología sirve de puente entre la investigación en inmunología básica y la salud pública. En Cuba la investigación y el desarrollo de la biotecnología se conciben como un ciclo científico completo (ciclo cerrado), desde el concepto hasta la aplicación clínica y comercialización de los productos. Los ingresos por las ventas del producto se invierten tanto en sostener el uso de las inmunoterapias en el sistema nacional de salud pública, como en la investigación y desarrollo de nuevas modalidades inmunoterapéuticas<sup>2,3</sup>.

Aunque las quimioterapias se han convertido en un arsenal indispensable para la reducción de la carga tumoral y el aumento de la supervivencia, su impacto en el cáncer de pulmón solo es medible en meses, con graves reacciones adversas como carga adicional. Por lo general, los pacientes con cáncer de pulmón enfrentan una etapa inicial de diagnóstico y tratamiento oncológico, durante la cual se obtiene la remisión parcial o completa, seguida de una segunda etapa, durante la cual la enfermedad progresa inexorablemente hacia la enfermedad terminal y la muerte. El mecanismo de acción de los productos inmunoterapéuticos, tales como los anticuerpos monoclonales (AcM) y las vacunas terapéuticas, es mucho más selectivo en la eliminación de las células tumorales y puede aumentar la supervivencia de los pacientes proporcionándoles una mejor calidad de vida<sup>4,5</sup>.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (REGF) es un oncogén bien conocido. Su sobreactivación puede inducir la transformación de una célula normal en maligna, señalizando la inhibición de la apoptosis, proliferación celular, angiogénesis, metástasis y de procesos proinflamatorios o inmunosupresores.

La vía de señalización y transducción del REGF puede ser interrumpida eficazmente por la privación de EGF, inhibición directa del receptor con AcM específicos, o moléculas de bajo peso molecular que compiten intracelularmente con el adenosín trifosfato (ATP) por el sitio de actividad tirosina quinasa del receptor, con repercusiones negativas sobre la proliferación celular y, por consiguiente, sobre el desarrollo del tumor<sup>6,7</sup>.

La inducción de la privación de EGF por la inmunoterapia activa es un concepto emergente desarrollado por investigadores cubanos, que incluye la manipulación de la respuesta inmune del individuo para que genere sus propios anticuerpos efectores (Acs) contra el EGF, reduciendo de esta forma el tamaño del tumor o impidiendo su progresión<sup>8-12</sup>.

SCIMAvaxEGF es una vacuna activa en la que los pacientes son inmunizados con Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), lo que genera anticuerpos dirigidos al propio EGF. El producto también se formula con la proteína externa P64k de *Neisseria meningitidis* y el ISA 51 de Montanide como coadyuvante para potenciar la respuesta inmune<sup>60</sup>. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es secuestrado por muchos tipos de cáncer, incluyendo cánceres de pulmón, colon, riñón y cabeza y cuello. Al aumentar los anticuerpos contra EGF, que es el ligando principal de EGFR, se reducen las concentraciones de EGF en la sangre. Así CIMAvaxEGF no apunta directamente a las células cancerosas, pero se espera que trabaje contra estos cánceres negando a los cánceres el estímulo de crecimiento que requieren. Por esta razón, el grupo de Roswell Park piensa que puede resultar más útil como una vacuna preventiva en lugar de como una terapia de cáncer *per se*<sup>61</sup>.

CIMAvaxEGF es una vacuna terapéutica contra el cáncer desarrollada totalmente en Cuba. Sus ingredientes farmacéuticos activos (IFA) se producen en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). La vacuna se formula en el Centro de Inmunología Molecular (CIM) y los ensayos clínicos se realizan en hospitales que reúnen las condiciones profesionales y tecnológicas para cumplir las normas de Buenas Prácticas Clínicas. La prueba de principio (POP, sigla en inglés) del impacto clínico de esta novedosa terapia fue posible por la integración del desarrollo biotecnológico cubano con el sistema de salud pública y la co-

laboración entre los institutos de investigaciones y los hospitales<sup>13,14</sup>.

Desde 1995 CIMAvaxEGF se ha sometido a cinco ensayos clínicos fase I/II y uno fase II. Los resultados de estas investigaciones condujeron a que el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) (CECMED), autoridad reguladora cubana, concediera la licencia a esta vacuna terapéutica para su uso en pacientes adultos con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) en estadios IIIB/IV. Los resultados de las investigaciones también se han publicado en varias revistas científicas nacionales e internacionales<sup>28,49</sup>.

El EGFR está sobreexpresado en muchos tumores epiteliales. El EGF es uno de los factores de crecimiento más importantes que estimula el EGFR, de forma parácrina. CIMAvax-EGF es una vacuna terapéutica contra el cáncer destinada a inducir anticuerpos contra el EGF. Está compuesto por EGF recombinante conjugado a P64 de *N.Meningitidis* como portador y Montanide, como adyuvante. Los títulos de anticuerpos contra EGF aumentaron con la vacunación y la concentración de EGF en sueros mostró una reducción rápida después de la inmunización. La respuesta del anticuerpo anti-EGF se correlacionó directamente con la supervivencia global. CIMAvax-EGF fue seguro y los eventos adversos más frecuentes fueron dolor en el sitio de inyección de grado 1-2, fiebre, dolor de cabeza, náuseas, vómitos y escalofríos. La vacuna aumentó significativamente la supervivencia de los pacientes con NSCLC. La concentración de EGF se midió en la línea de base y se encontró que era mucho mayor que en sujetos normales. La alta concentración de EGF predijo mayor beneficio después de la vacunación. La respuesta de anticuerpos frente al EGF es un marcador de supervivencia. La alta concentración de EGF podría ser un marcador predictivo de la eficacia de la vacuna y un biomarcador de pronóstico pobre para los pacientes no vacunados con NSCLC. El valor predictivo y pronóstico de la concentración de EGF se validará prospectivamente<sup>62</sup>.

La vacunación con CIMAvax-EGF fue segura y prolongó la vida de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, sobre todo en aquellos con altos niveles de EGF en sangre al inicio<sup>58</sup>.

CIMAvaxEGF es una vacuna del CIM para el tratamiento de cáncer de pulmón. Para su aprobación se hace necesaria una fase de experimentación en la que se evalúan los efectos de los tratamientos usuales. Para ello se hace necesario primeramente un proceso de selección de los ensayos clínicos que se realiza según el criterio PRISMA<sup>15-17</sup>.

El objetivo de este artículo es revisar las investigaciones clínicas realizadas durante el desarrollo de esta novedosa vacuna terapéutica cubana contra el cáncer, principalmente sobre la base de estudios publicados por investigadores cubanos en revistas científicas internacionales arbitradas

## Métodos

En Medicina, meta-análisis es el estudio basado en la integración estructurada y sistemática de la información obtenida en diferentes ensayos clínicos, sobre un problema de salud determinado. Consiste en identificar y revisar los estudios controlados sobre un determinado problema, con el fin de dar una estimación cuantitativa sintética de todos los estudios disponibles. Dado que incluye un número mayor de observaciones, un meta-análisis tiene un poder estadístico superior al de los ensayos clínicos que incluye.

Un meta-análisis clínico se basa principalmente en una integración o reciclaje entre la información ya obtenida y poder obtener un análisis mayor.

El primer meta-análisis clínico fue realizado por Karl Pearson en 1904, en un intento de superar el problema del reducido poder estadístico de los estudios con pequeños tamaños muestrales; si se analizan los resultados de un grupo de estudios similares, se puede alcanzar una valoración más exacta de los efectos.

En Estadística, un meta-análisis se refiere al conjunto de métodos enfocados a contrastar y combinar los resultados de diferentes estudios; con la esperanza de identificar patrones entre los resultados de estudio, las fuentes de desacuerdo entre dichos resultados, u otras relaciones interesantes que pueden salir a la luz en el contexto de múltiples estudios.

En su más simple forma, se lleva a cabo al identificar una medida común del tamaño de efecto; del cual un promedio ponderado podría ser el dato de salida en un meta-análisis. La ponderación podría estar relacionada con tamaños de muestra dentro de los estudios individuales.

El objetivo general de un meta-análisis radica en estimar con mayor fuerza el tamaño real de efecto, en contraste a uno menos preciso derivado en un solo estudio bajo un sencillo conjunto determinado de supuestos y condiciones.

En la Tabla 1 se dispone de 12 ensayos clínicos, de estos se rechazan 5 por ser ensayos piloto, que tienen como objetivo definir las condiciones de experimentación, y 4 por ser no controlados, o sea no tener un brazo de contraste o control. Este proceso es rectorado por los criterios PRISMA que pueden ser consultados en [15], ver Figura 1. Se incluyen finalmente 3 ensayos controlados: EC056, EC081, EC111. En la Tabla 2 se resume el tamaño de

Ensayos Código en RPCEC	N	Tratamiento	Mediana de Supervivencia (meses)	Fuente
<b>IICRD-EC019 Piloto I</b> En Edición	10	5 EGF /TT/AL 5 EGF/P64k/AL Esquema QVV	3.0 3.0	18, 19
<b>IICRD-EC025 Piloto II</b> En Edición	34	17 EGF/P64k/AL 17 EGF/P64k/Montanide ISA 51 Esquema QVV	4.1 5.4	20, 21
<b>IICRD-EC033 Piloto III</b> En Edición	25	13 EGF/P64k/AL 12 EGF/P64k/Montanide ISA 51 Esquema QVV	4.3 7.1	20, 22
<b>IICRD-EC041 Piloto IV</b> En Edición	43	22 EGF/P64k/AL (1 deltoide) vs 21 EGF/P64k/AL (2 deltoides) Esquema QVV	6.4 7.1	23, 24
<b>IICRD-EC062 Piloto V</b> En Edición	21	EGF/P64k/Montanide ISA 51 (4 sitios: (2 deltoides, 2 glúteos) Esquema VQV	12.8	45
<b>IICRD-EC056 Fase II</b> En Edición	80	40 EGF/P64k/Montanide ISA 51 40 Control (4 sitios) Esquema QVV	12.7 8.5	32,47,48
<b>IICRD-EC081 Fase III</b> RPCEC00000161	405	270EGF/P64k/Montanid e ISA 51 135 Control	10.4 8.9	56-58

**Tabla 1. Ensayos clínicos realizados en Cuba con la vacuna terapéutica anticancerosa de EGF, 1995–2015**

Leyenda: RPCEC (Registro Público Cubano de Ensayos Clínicos)

QVV: Quimioterapia-Vacuna-Vacuna

VQV: Vacuna-Quimioterapia-Vacuna



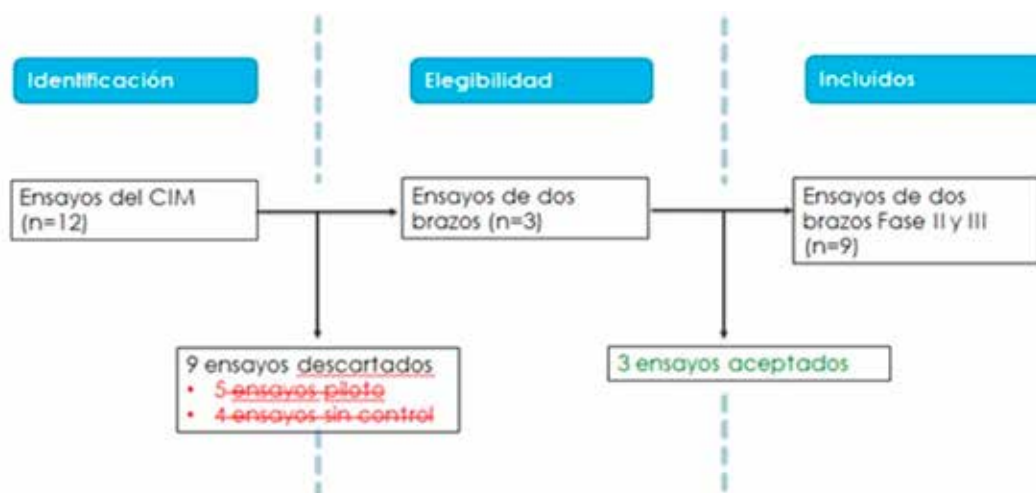


Figura 1. Proceso de selección de los estudios con la vacuna CIMAvaxEGF

Ensayo	Vacuna n (%)	Control n (%)	Total
EC056 EGF Fase II	40 (10.8%)	40 (17.2%)	80 (13.3%)
EC081 Fase III QVV	270 (73.4%)	134 (57.8%)	404 (67.3%)
EC111 Fase III VQV	58 (15.8%)	58 (25.0%)	116 (19.4%)
<b>Total</b>	<b>368 (100%)</b>	<b>232 (100%)</b>	<b>600 (100%)</b>

Tabla 2: Población incluida

Ensayo	HR	esHR
EC056	0.823	0.182
EC081	0.818	0.188
EC111	0.071	0.209

Tabla 3: HR y error estándar

cada uno de los ensayos, y la proporción de población dentro del meta-análisis. Al final se obtiene que: el tamaño de la población total en estos tres ensayos es de (13.3%, 67.3%; 19.4%) de 600 pacientes<sup>49-55</sup>.

Se seleccionó para evaluar el tamaño del efecto, el Hazard Ratio (HR), sugerido en para este tipo de datos (tiempo hasta el evento)<sup>15</sup>. En la Tabla 3 se resumen los tamaños de efecto obtenidos, así como su error estándar, datos estos necesarios para la implementación del meta-análisis.

En esta sección se resumirán los resultados obtenidos de la aplicación de los modelos a cada vacuna de forma independiente, y posteriormente se unirán buscando el tamaño de efecto combinado. Para realizar el meta-análisis se utilizó el software Review Manager 5 Versión 5.0.20 y los métodos para analizarlos. Se asume el modelo de efectos fijos, pues se dispone de los datos individuales de cada ensayo<sup>15,17</sup>.

En la Figura 2 se muestran los resultados de HR y su intervalo de confianza del 95%. Hay dos indicadores de que el efecto combinado es favorable a la vacuna: el p-valor, que se encuentra por debajo de 0.05, y el z-valor, que es mayor en módulo que 1.96 que es el valor crítico de admisión, o sea el valor que marca la región donde el efecto no es significativo. Se muestran los resultados del Forest Plot, de la prueba de heterogeneidad el valor de I<sup>2</sup> y su intervalo de confianza que corrobora los resultados anteriores.

El ensayo de mayor peso 37.1% es el EC056, por la consistencia de los datos. Se chequeó la heterogeneidad según los criterios Cochrane<sup>15</sup>. Se puede concluir parcialmente que el efecto es favorable a la vacuna CIMAvaxEGF, pues el diamante (que representa el efecto combinado y sus intervalos de confianza) no atraviesa la hipótesis nula. En la Figura 3 se muestra el análisis de sensibilidad, necesario para revelar cual es el estudio más discordante. En la misma aparece el HR y su intervalo de confianza al 95% omitiendo

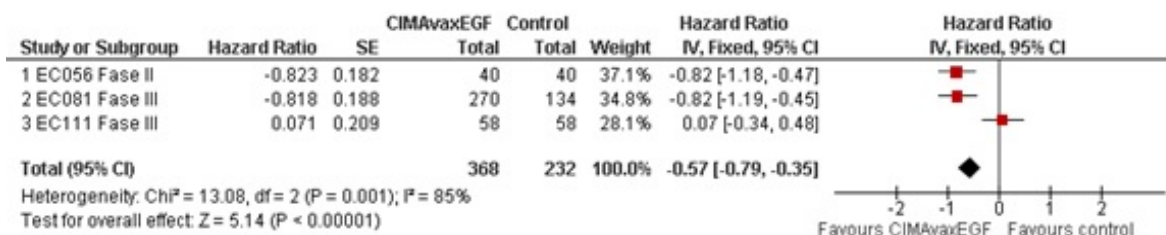


Figura 2: Forest plot para el modelo de efectos fijos

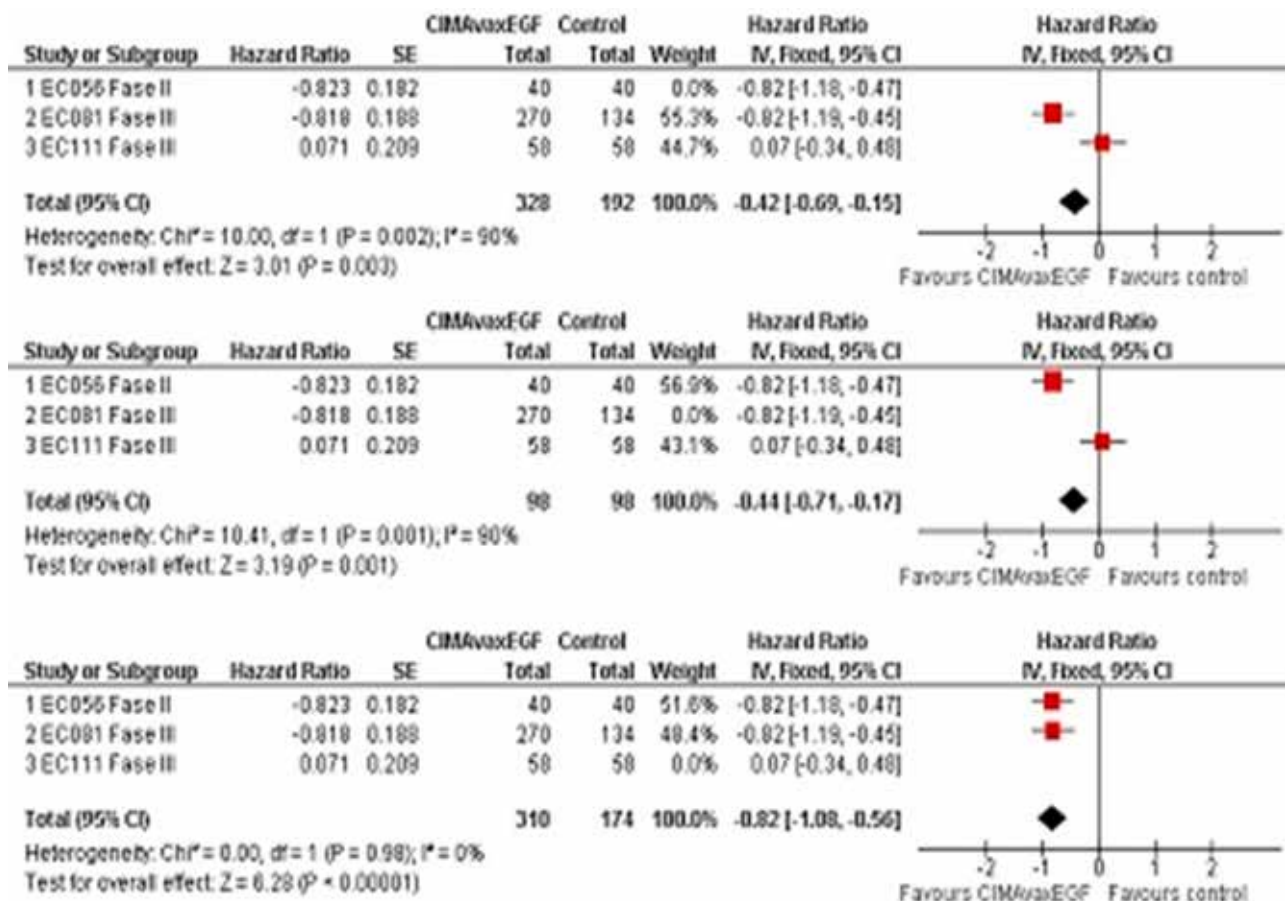


Figure 3: Análisis de sensibilidad EGF

En esta salida de Review Manager 5 Versión 5.0.20 es posible observar que el estudio que más difiere de los demás es el EC111, pues cuando es omitido el  $I^2$  desciende al 0%

cada uno de los ensayos, así como la estimación combinada de todos los estudios a la vez. Se presentan los resultados del Forest Plot que corrobora los resultados anteriores.

En la Figura 4 se muestra el análisis acumulativo, necesario para revelar cuál es el estudio más discordante. En la misma aparece el HR y su intervalo de confianza al 95% añadiendo cada uno de los ensayos, así como la estimación combinada de todos los estudios a la vez. Se presentan los resultados del Forest Plot que corrobora los resultados anteriores.

## Conclusiones

El meta-análisis combinado arroja resultados favorables a la vacuna CIMAvaxEGF, con un HR de 0.57.

El análisis de sensibilidad revela que el ensayo que más difiere de los demás es el EC111 Fase III.

El análisis acumulativo refleja que el estudio que menos aporta al meta-análisis fue el último incluido.

## Recomendaciones

Repetir el meta-análisis incluyendo los nuevos ensayos que se vayan terminando para aumentar poder estadístico al estudio.

Predecir el tamaño del efecto de los nuevos ensayos a través de la inferencia de los valores de supervivencia.

Segmentar la población en grupos temporales de supervivencia.

## Referencias bibliográficas

- Galán Y, Fernández L, Torres P, García M. Trends in Cuba's Cancer Incidence (1990 to 2003) and Mortality (1990 to 2007). MEDICC Review. 2009;11(3):19–26.
- Romero T. Changing the Paradigm of Cancer Control in Cuba. MEDICC Review. 2009;11(3):5–7.
- Lage A. Connecting immunology research to public health: Cuban biotechnology. Nature Immunology. 2008;9(2):109–12.
- Lage A. Transforming Cancer Indicators Begs Bold New Strategies from Biotechnology. MEDICC Review. 2009;11(3):8–12.
- Gerard C, Debruyne C. Immunotherapy in the landscape of new targeted treatments for non-small cell lung cancer. Mol Oncol. 2009 Dec;3(5–6):409–24.



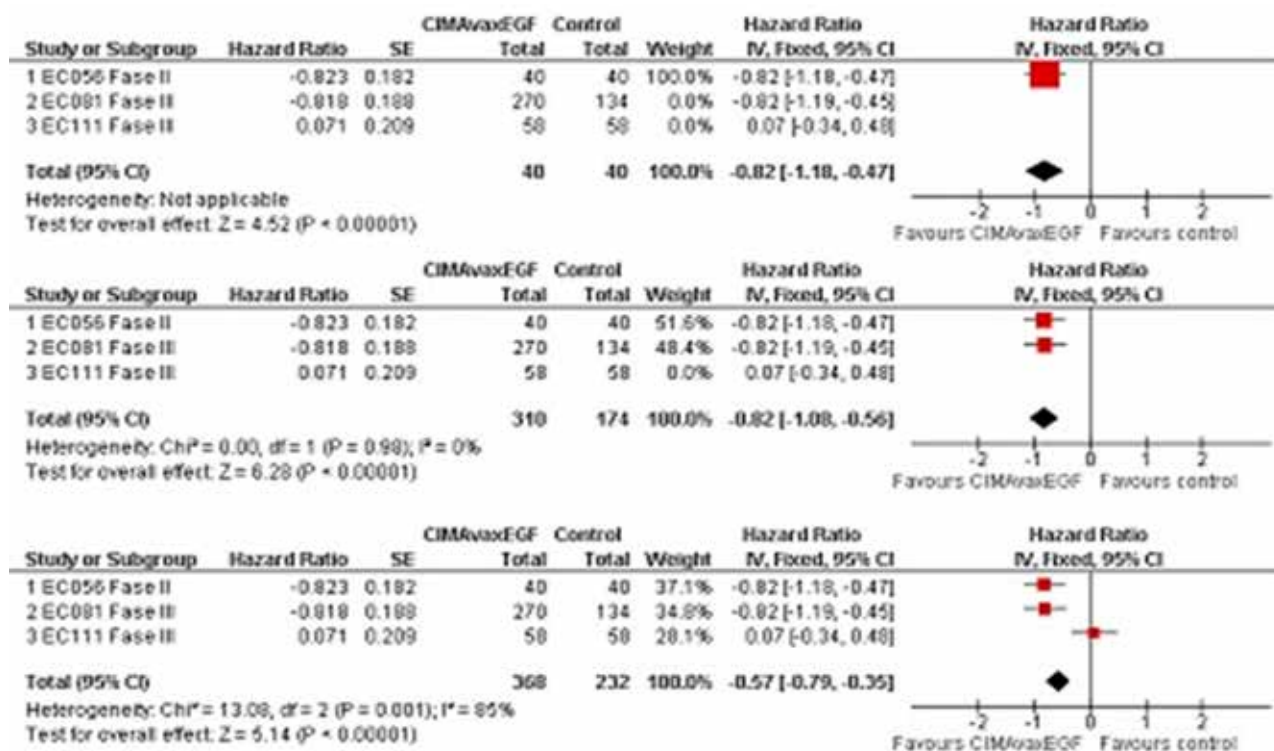


Figure 4: Análisis acumulativo

En esta salida de Review Manager 5 Versión 5.0.20 es posible observar que el estudio que más difiere de los demás es el EC111, pues cuando se añade este ensayo el I<sup>2</sup> asciende desde 0%.

- Toffoli G, De Mattia E, Cecchin E, Biason P, Masier S, Corona G. Pharmacology of epidermal growth factor inhibitors. *Int J Biol Markers*. 2007 Jan-Mar;22(1 Suppl 4):S24-39.
- Hirsch FR, Varella-García M, Cappuzzo F. Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer. *Oncogene*. 2009 Aug;28 Suppl 1:S32-7.
- González G, Lage A. Cancer Vaccines for Hormone/Growth Factor Immune Deprivation: A Feasible Approach for Cancer Treatment. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007 May;7(3):229-41.
- Macías A, Azavedo E, Hägerström T, Klintonberg C, Pérez R, Skoog L. Prognostic significance of the receptor for epidermal growth factor in human mammary carcinoma. *Anticancer Res*. 1987 May-Jun;7(3 Pt B):459-64.
- Arteaga CL. ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp Cell Res*. 2003 Mar 10;284(1):122-30.
- Lage A, Crombet T, González G. Targeting epidermal growth factor receptor signaling: early results and future trends in oncology. *Ann Med*. 2003;35(5):327-36.
- Pérez R, Pascual M, Macías A, Lage A. Epidermal growth factor receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1984 Sep;4(3):189-93.
- González G, Sánchez B, Suárez E, Beausoleil I, Perez O, Lastre M, et al. Induction of immune recognition of self-epidermal growth factor (EGF): effect on EGF biodistribution and tumor growth. *Vac Res*. 1996;5(4):233-44.
- González G, Pardo OL, Sánchez B, García JL, Beausoleil I, Marinello P, et al. Induction of immune recognition of self-epidermal growth factor II: characterization of the antibody immune response and the use of a fusion protein. *Vac Res*. 1997;6(2):91-100.
- J. Ballesteros. Revisión sistemática y meta-análisis de ensayos clínicos. UPV/EHU. Material de Conferencia. Habana. 2015.
- M. Borenstein et al. Introduction to Meta-analysis. Wiley. UK. 2009
- P. Ellis. The Essential Guide to Effect Sizes. Cambridge University Press. UK. 2010.
- González G, Crombet T, Catalá M, Mirabal V, Hernández JC, González Y, et al. A novel cancer vaccine composed of human-recombinant epidermal growth factor linked to a carrier protein: report of a pilot clinical trial. *Ann Oncol*. 1998 Apr;9(4):431-5.
- Hirsch FR, Herbst RS, Olsen C, Chansky K, Crowley J, Kelly K, et al. Increased EGFR Gene Copy Number Detected by Fluorescent In Situ Hybridization Predicts Outcome in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated With Cetuximab and Chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 10;26(20):3351-7.
- González G, Crombet T, Torres F, Catalá M, Alfonso L, Osorio M, et al. Epidermal growth factor-based cancer vaccine for non-small-cell lung cancer therapy. *Ann Oncol*. 2003 Mar;14(3):461-6.
- Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol*. 2004 Feb;34(2):336-44.
- Man S, Bocci G, Francia G, Green SK, Jothy S, Hanahan D, et al. Antitumor effects in mice of low-dose (metronomic) cyclophosphamide administered continuously through the drinking water. *Cancer Res*. 2002 May 15;62(10):2731-5.
- González G, Crombet T, Neninger E, Viada C, Lage A. Therapeutic vaccination with epidermal growth factor (EGF) in advanced lung cancer: analysis of pooled data from three clinical trials. *Hum Vaccin*. 2007 Jan-Feb;3(1):8-13.
- Crombet T, Neninger E, Catalá M, García B, Leonard I, Martínez L, et al. Treatment of NSCLC Patients with an EGF-Based Cancer Vaccine: report of a Phase I trial. *Cancer Biol Ther*. 2006 Feb;5(2):130-40.
- Berd D, Sato T, Maguire HC Jr, Kairys J, Mastrangelo MJ. Immunopharmacologic analysis of an autologous, hapten-modified human melanoma vaccine. *J Clin Oncol*. 2004 Feb 1;22(3):403-15.
- Gardiner DF, Huang Y, Basu S, Leung L, Song Y, Chen Z, et al. Multiple-site DNA vaccination enhances immune responses in mice. *Vaccine*. 2006 Jan 16;24(3):287-92.
- Aucouturier J, Ascarateil S, Dupuis L. The use of oil adjuvants in therapeutic vaccines. *Vaccine*. 2006 Apr 12;24 Suppl 2:S2-44-5.
- Lage A, Pérez R, Fernández LE. Therapeutic cancer vaccines: at midway between immunology and pharmacology. *Curr Cancer Drug Targets*. 2005 Dec;5(8):611-27.
- Zinkernagel RM, Hengartner H. Regulation of the immune response by antigen. *Science*. 2001 Jul 13;293(5528):251-3.
- Starzl TE, Zinkernagel RM. Antigen localization and migration in immunity and tolerance. *N Engl J Med*. 1998 Dec 24;339(26):1905-13.
- Couch M, Saunders JK, O'Malley BW Jr, Pardoll D, Jaffee E. Spatial distribution of tumor vaccine improves efficacy. *Laryngoscope*. 2003 Aug;113(8):1401-5.
- Rodríguez PC, González I, González A, Avellanet J, López A, Pérez R, et al. Priming and boosting determinants on the antibody response to

- an Epidermal Growth Factor-based cancer vaccine. *Vaccine*. 2008 Aug 26;26(36):4647–54.
33. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57–70. Review.
  34. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoe-  
diting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329–60.
  35. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles'  
Heel. *Cancer Cell*. 2008 Jun;13(6):472–82. Review.
  36. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflamma-  
tion. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436–44. Review.
  37. Mantovani A. Inflaming Metastasis. *Nature*. 2009 Jan 1;457(7225):36–7.
  38. Emens LA, Jaffee EM. Leveraging the activity of tumor vaccines with  
citotoxic chemotherapy. *Cancer Res*. 2005 Sep 15;65(18):8059–64.
  39. Dass S, Vital EM, Emery P. Development of psoriasis after B cell de-  
pletion with rituximab. *Arthritis Rheum*. 2007 Aug;56(8):2715–8.
  40. Goetz M, Atreya R, Ghaliba A, Galle PR, Neurath MF. Exacer-  
bation of ulcerative colitis after rituximab salvage therapy. *Inflamm  
Bowel Dis*. 2007 Nov;13(11):1365–8.
  41. Terando A, Mulé JJ. On combining antineoplastic drugs with tumor  
vaccines. *Cancer Immunol Immunother*. 2003 Nov;52(11):680–5.
  42. Ehrke MJ. Immunomodulation in cancer therapeutics. *Int Immuno-  
pharmacol*. 2003 Aug;3(8):1105–19. Review.
  43. Cupps TR, Edgar LC, Fauci AS. Suppression of human B lymphocyte  
function by cyclophosphamide. *J Immunol*. 1982 Jun;128(6):2453–7.
  44. Sinkovics JG, Horvath JC. Evidence accumulating in support of can-  
cer vaccines combined with chemotherapy: a pragmatic review of past  
and present efforts. *Int J Oncol*. 2006 Oct;29(4):765–77.
  45. Neningen E, Verdecia BG, Crombet T, Viada C, Pereda S, Leonard I, et  
al. Combining an EGF-based cancer vaccine with chemotherapy in ad-  
vanced nonsmall cell lung cancer. *J Immunother*. 2009 Jan;32(1):92–9.
  46. Montero E, Valdés M, Avellanet J, López A, Pérez R, Lage A. Chemo-  
therapy induced transient B-cell depletion boosts antibody-forming  
cells expansion driven by an epidermal growth factor-based cancer  
vaccine. *Vaccine*. 2009 Apr 6;27(16):2230–9.
  47. Neningen Vinageras E, de la Torre A, Osorio Rodríguez M, Catalá  
Ferrer M, Bravo I, Mendoza del Pino M, et al. Phase II randomized  
controlled trial of an epidermal growth factor vaccine in advanced  
NSCLC. *J Clin Oncol*. 2008 Mar 20;26(9):1452–8.
  48. García B, Neningen E, de la Torre A, Leonard I, Martínez R, Viada C,  
et al. Effective Inhibition of the Epidermal Growth Factor/Epidermal  
Growth Factor Receptor Binding by Anti-Epidermal Growth Factor  
Antibodies Is Related to Better Survival in Advanced Non Small-Cell  
Lung Cancer Patients Treated with the Epidermal Growth Factor Can-  
cer Vaccine. *Clin Cancer Res*. 2008 Feb 1;14(3):840–6.
  49. CIMAvax EGF® Conjugado químico de Factor de Crecimiento  
Epidérmico humano recombinante acoplado a la proteína recom-  
binante rP64K, Número de Registro B- 08- 063- L03- C, Centro de In-  
munología Molecular (CIM), Cuba. Centro para el Control de la Cal-  
idad de los Medicamentos (CECMED). Havana, Cuba; 2008 June 12.
  50. Rodríguez G, González G, Crombet T, Lage A. CIMAvax EGF Devel-  
opment and Manufacturing. *Biopharm International*. 2008 Oct; Suppl  
1:S36–42.
  51. Schlom J, Arlen PM, Gulley JL. Cancer Vaccines: Moving Beyond  
Current Paradigms. *Clin Cancer Res*. 2007 Jul 1;13(13):3776–82.
  52. Hoos A, Parmiani G, Hege K, Sznol M, Loibner H, Eggermont A, et al.  
A Clinical Development Paradigm for Cancer Vaccines and Related  
Biologics. *J Immunother*. 2007 Jan;30(1):1–15.
  53. Fine GD. Consequences of delayed treatment effects on analysis of  
time-to-event endpoints. *Drug Inf J*. 2007;41(4):535–9.
  54. Madan RA, Mohebtash M, Schlom J, Gulley JL. Therapeutic vaccines  
in metastatic castration-resistant prostate cancer: principles in clinical  
trial design. *Expert Opin Biol Ther*. 2009 Oct 27;10(1):1–10.
  55. Crombet T, Rodríguez PC, Neningen E, García B, Lage A. CIMAvax  
EGF (EGF-P64K) vaccine for the treatment of non-small-cell lung  
cancer. *Expert Rev Vaccines*. 2015 Oct;14(10):1303–11.
  56. Viada C, Dupuy JF, Fors M, Luaces P, González G, Neningen E, et  
al. CIMAvax®EGF vaccine therapy for non-small cell lung cancer:  
A weighted log-rank tests-based evaluation. *Modern Chemotherapy*  
2013, 2(3):51–56.
  57. Viada C, Dupuy JF, Fors M, Rodríguez PC, González G, et al. Stratified  
Cox Regression Analysis of Survival under CIMAvax®EGF Vaccine.  
*Journal of Cancer Therapy*, 2013, 4, 8–14.
  58. Rodríguez PC, Popa X, Martínez O, Mendoza S, Santiesteban E, Cre-  
spo T et al. A Phase III Clinical Trial of the Epidermal Growth Factor  
Vaccine CIMAvax-EGF as Switch Maintenance Therapy in Advanced  
Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2016 Feb 29.  
Epub 2016 Feb 29.
  59. del Cristo IS, Fors MM, Viada C, Guerra PP, Hernández A, Hernández  
M. Experiencias de un ensayo clínico en la atención primaria de salud.  
*Revista Bionatura*. 2015; 1(1):20–30.
  60. Rodríguez, PC; Rodríguez, G; González, G; Lage, A (2010). "Clinical  
development and perspectives of CIMAvax EGF, Cuban vaccine for  
non-small-cell lung cancer therapy". *MEDICC Review*. 12 (1): 17–23.  
PMID 20387330.
  61. Patel, N. (11 May 2015). "Cuba Has a Lung Cancer Vaccine—And  
America Wants It". *Wired*. Retrieved 2015-05-13.
  62. Crombet T, Neningen E, Gonzalez J, Rodriguez PC, Garcia B, Popa X,  
Mazorra Z, Viada C, Luaces P, González G, Lage A. EGF-based cancer  
vaccine: Optimizing predictive and surrogate biomarkers. *J Clin On-  
col* 31, 2013 (suppl; abstr 3013)

**Recibido:** diciembre 2016

**Aprobado:** febrero 2017



## INVESTIGACIÓN

## Evaluación de las condiciones de cultivo de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* a nivel de laboratorio, con inulina como fuente de carbono.

Evaluation of culture conditions of *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* on laboratory scale, with inulin as carbon source.

James, M.1\*, Velastegui, E1. Cruz, M.A1.

DOI. 10.21931/RB/2017.02.01.4

## RESUMEN

*Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* son bacterias ácido lácticas que funcionan como probióticos, generalmente son usadas para la formulación de alimentos funcionales y crecen en condiciones de cultivo similares. Ambas especies de *Lactobacillus* metabolizan azúcares específicos. La inulina es un fructooligosacárido cuya función prebiótica contribuye a la proliferación de la micro-flora intestinal y evita el crecimiento de microorganismos patógenos. En el presente trabajo se evaluó la concentración de inulina tanto de grado molecular como de grado reactivo, así como el pH del medio en sistemas fermentativos aerobios. Se obtuvo un medio óptimo para el crecimiento de *Lactobacillus casei* suplementado con 43,1g/L de inulina grado reactivo a un pH de 7,47; para *Lactobacillus acidophilus* se requiere de mayores estudios para determinar las condiciones óptimas tanto de concentración de inulina como de pH.

**Palabras clave:** Fermentación aeróbica, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, inulina, pH.

## ABSTRACT

*Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* are lactic acid bacteria that function as probiotics, are generally used for the formulation of functional foods and the bacteria growth happens under similar culture conditions. Both species of *Lactobacillus* metabolize specific sugars. Inulin is a fructooligosaccharide whose prebiotic function contributes to the proliferation of intestinal micro-flora and prevents the growth of pathogenic microorganisms. In the present work, the inulin concentration of both molecular grade and reactive grade was evaluated, as well as the pH of the medium in aerobic fermentative systems. An optimal growth medium for *Lactobacillus casei* supplemented with 43.1 g/L of reagent grade inulin was obtained at a pH of 7.47. For *Lactobacillus acidophilus* further studies are required to determine the optimal conditions for both inulin concentrations and pH.

**Key words:** Aerobic fermentation, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, inulin, pH.

## Introducción

Existe una problemática en torno a las enfermedades de tipo gastrointestinal que desencadenan cuadros patológicos importantes en humanos como: gastritis, colon irritable e incluso cáncer. Estudios han demostrado que una de las soluciones menos agresivas y más efectivas recae en el consumo de productos que contengan probióticos, esto se debe a que dichos microorganismos tienen la habilidad de reconstruir la flora intestinal mejorando así el proceso de digestión<sup>1</sup>. Las enfermedades infecciosas bacterianas son tratadas generalmente con antibióticos, estos al ser de amplio espectro eliminan a los patógenos conjuntamente con la micro-flora intestinal benéfica; además de que los efectos de los antibióticos son agresivos, estos pueden generar resistencia por parte de los patógenos<sup>2</sup>. Estos problemas han generado la necesidad de buscar nuevos métodos que beneficien de manera directa a la reconstrucción de la flora intestinal. Se ha propuesto al consumo de probióticos como la alternativa más eficaz para atacar los distintos problemas presentados.

Los probióticos son microorganismos, generalmente bacterias ácido lácticas (LBA), que poseen la

habilidad de modificar la microbiota intestinal evitando la generación de microorganismos patógenos en el sistema digestivo<sup>3</sup>. Los *Lactobacillus spp.* son bacterias ácido lácticas Gram positivas anaerobias aero-tolerantes y homofermentativas; la mayoría de especies forman parte del consorcio microbiano del tracto intestinal<sup>4</sup>.

*Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* tienen un efecto protector en el sistema gastrointestinal debido a su importante rol en el sistema inmune. Por ejemplo, *L. acidophilus* evita la adherencia de *Candida albicans* en el tracto digestivo impidiendo la producción de biofilms de la levadura ya que reducen su capacidad filamentosas, mediante la regulación inmunológica mediada por citoquinas<sup>5</sup>. Otro ejemplo de respuesta inmunológica es dado por *L. casei*, este contribuye a la disminución de células cancerígenas en un 80 % debido a su actividad antitumoral, evidenciadas en con-cultivos con células epiteliales cancerosas<sup>6</sup>.

La inulina es un fructooligosacárido (FOS) compuesto por una cadena lineal de fructosas unida por enlaces  $\beta$  1-2; en su extremo reductor se encuentra vinculada una molécula de glucosa por enlaces  $\alpha$  1-2. Dicho azúcar posee funciones prebióticas en bacterias

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

Correspondence: Mariuxy James. 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) 0987808987 Correo electrónico: \*mjames@udlanet.ec

LBA, generando efectos protectores inmunológicos; esto se da mediante el metabolismo de la molécula y su almacenamiento final en la célula<sup>7</sup>.

La importancia de esta investigación recae en la obtención de datos útiles para procesos de masificación. Esto permitirá formular alimentos funcionales donde exista una relación productiva entre el crecimiento de *Lactobacillus* y el consumo del prebiótico; además, los datos generados permitirán la mejora de condiciones de cultivo y disminución de tiempos de fermentación mediante la optimización de las condiciones de cultivo con el fin de generar las mayores concentraciones de biomasa de ambas cepas (*L. acidophilus* y *L. casei*). La importancia de la evaluación de propiedades físico-químicas en el crecimiento bacteriano recae en la influencia del pH en el metabolismo de la inulina por los probióticos en condiciones de fermentación aerobia. Los parámetros cinéticos (rendimientos, velocidades de crecimiento, tiempo de duplicación, consumo de sustrato, etc.) fueron analizados y relacionados entre sí para desarrollar un medio de cultivo óptimo que sea la base de la formulación de un producto alternativo y económico en el que se emplee a la inulina como prebiótico del *Lactobacillus spp.* (alimento funcional simbiótico).

## Métodos

### Cultivo de *Lactobacillus*

Para la activación de *Lactobacillus acidophilus* ATCC<sup>®</sup> 314 y *Lactobacillus casei* ATCC<sup>®</sup> 334. Se cultivó en caldo MRS modificado y se incubó cada producto liofilizado en un periodo de 72 horas a 37°C y 127 rpm. Una vez activadas las cepas se preservó el cultivo madre a 4°C y se realizaron sub-cultivos cada 3 semanas.

Se modificó el medio MRS para el crecimiento de *Lactobacillus spp.* basándose en la composición del medio original<sup>8</sup>. Obteniendo así la siguiente formulación: nitrato de amonio 2,85g/L (Merck<sup>®</sup>); acetato de sodio trihidratado 5g/L (Fisher Chemicals); sulfato de manganeso hidratado 0,05g/L (Loba Chemie); fosfato de sodio 2 g/L (AppliChem GmbH-an ITW Company); tween-80 1g/L; peptona 10g/L (Merck<sup>®</sup>); dextrosa 20g/L (Becton, Dickinson & Company); extracto de levadura 5g/L (Becton, Dickinson & Company); caldo cerebro corazón 10g/L (Becton, Dickinson & Company).

### Determinación de parámetros cinéticos

Cada ensayo realizado en este proyecto fue analizado con respecto a la obtención de los siguientes parámetros cinéticos: velocidad de crecimiento, velocidad máxima de crecimiento, tiempo de duplicación, productividad global, productividad máxima y rendimientos.

### Ensayos de selección de pH

Para este ensayo se realizó un medio basal MRS modificado (sin fuente de carbono), donde se agregó por separado 30g/L de inulina grado reactivo (Beneo<sup>™</sup> GR) y 30g/L de inulina grado molecular (Inulin from chicory sigma<sup>®</sup>). Para evitar que el pH de los medios de cultivo varié después de su esterilización e inoculación, se completó el volumen final del medio con tampones: para los medios que varían entre pH de 3,5 a 5,5 se usó tampón citrato 1M y para los medios que varían entre pH de 6 a 7,5 se completó con tampón Tris base HCl 0,01 M. Posteriormente, se inoculó ambas cepas por separado en los distintos tratamientos y se incubó los tubos de ensayo a 37°C, 127 rpm por 72 horas.

### Ensayos de selección de inulina

Se formuló el medio basal MRS caldo modificado a un pH constante de 6,5. Posteriormente se añadió inulina al medio en un rango de 10 a 50g/L de concentración en intervalos de 10g/L. Se inoculó ambas cepas por separado en los distintos tratamientos y

se incubó los tubos de ensayo a condiciones constantes de 37 °C, 127 rpm por 72 horas.

### Diseño experimental

Se planteó un diseño central compuesto rotacional (DCCR) 2<sup>k</sup>, para permitir el análisis del proceso de optimización de los medios, a partir de los datos obtenidos en los ensayos de selección de pH e inulina. Las variables de estudio fueron la variación de pH y la variación en la concentración de inulina; mientras que la variable de respuesta fue la concentración de biomasa (g/L); obteniendo una ecuación de segundo orden.

### Optimización de concentración de inulina y pH

Para la validación se utilizó medio MRS caldo basal modificado, empleando el medio optimizado resultante del diseño experimental. Se usó la fórmula cuadrática (ecuación 1) dada en el diseño de superficie de respuesta para obtener los valores ideales de las variables de estudio (pH y concentración de inulina).

$$y = ax_1 + bx_2 + cx_1^2 + dx_2^2 + ex_1x_2 + f$$

**Ecuación 1.** Fórmula cuadrática dada en el diseño de superficie de respuesta para obtener los valores ideales de las variables de estudio

Se inoculó 2,02 x 10<sup>-1</sup> g/L de *Lactobacillus casei* y se midió la biomasa por densidad óptica para el crecimiento de biomasa como el consumo de sustrato a 600nm y 540nm respectivamente. Se añadió el análisis de rendimientos y su comparación con el crecimiento bacteriano.

### Análisis de datos

Se emplearon los softwares EXCEL 2010, STATISTICA versión 13.0 e IBM SPSS Statistics 24 para la obtención de datos de selección de las variables de pH y concentración de inulina tanto grado molecular como grado reactivo. También se empleó ambas herramientas para la formulación y recopilación de datos del diseño experimental. Todos los experimentos fueron analizados con un nivel de confianza del 95%. En los ensayos de selección tanto de pH como de inulina, se realizó un análisis de contraste de medias. Se analizó cada grupo de muestras de variable de respuesta (crecimiento de biomasa) con su respectiva variable independiente; además se contrastó la linealidad de las muestras. Obteniendo en todos los ensayos un error estándar menor a 0,05.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### Ensayos de selección de pH.

Se obtuvo mayor crecimiento de *L. acidophilus* a pH 6,5 con inulina grado molecular y 7,5 con inulina grado reactivo comparado con los otros tratamientos (figura 1). Esto se debe a que en sistemas aerobios el crecimiento de biomasa se favorece a pH neutros; donde el potencial de reducción juega un papel importante en el metabolismo de las moléculas. Los crecimientos de las cepas no entran en los rangos estándares mencionados en fichas e investigaciones previamente realizadas (pH básicos). Un estudio previo<sup>10</sup>, demuestra que los parámetros de agitación y el uso del sustrato contribuyen a que la cepa se desarrolle en pH más básicos. Por lo tanto, se sugiere que el pH tiene influencia sobre el desarrollo de *L. acidophilus* interviniendo en rutas de producción de metabolitos o la inhibición de los mismos. Otra investigación demostró que el pH óptimo para la masificación de *L. acidophilus* se encuentra en un rango de 6 hasta 7,5.<sup>11</sup>

En esta investigación se comprobó que existió mayor crecimiento de biomasa de *L. casei* a pH 7 con inulina grado molecular y pH 7,5 con inulina grado reactivo (figura 1). Diferentes investigaciones demuestran que *L. casei* tiende a crecer a pH más básico



La inulinasa es la enzima predilecta para cortar los enlaces b 1-2 de la inulina, convirtiendo al FOS en monómeros de glucosa y fructosa; esta es producida por muchas bacterias, en especial *Lactobacillus spp.* estudios demuestran que la producción de la enzima genera inhibición de producto<sup>14</sup>. Investigaciones previas indican que la acción de la inulinasa sobre la inulina varía según el pH; la enzima degrada una molécula de inulina de manera

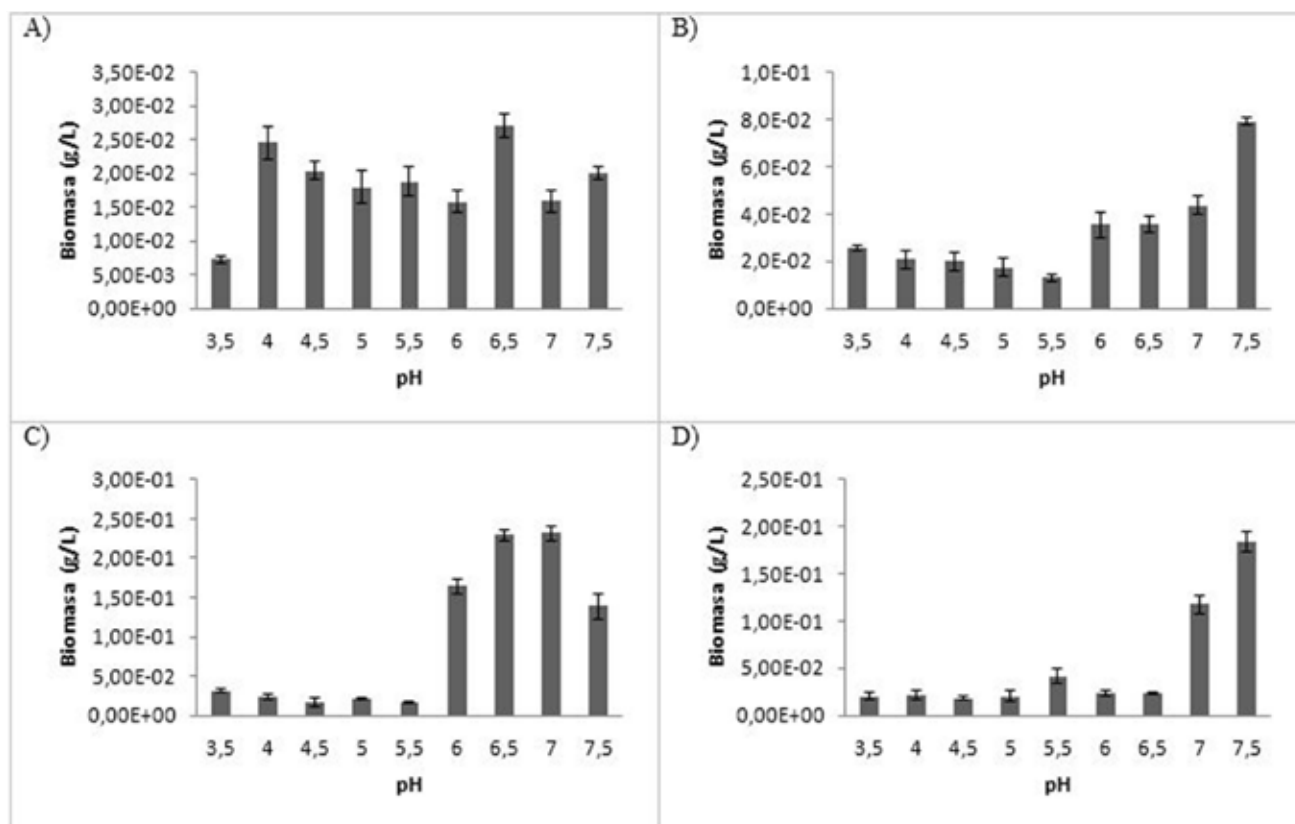


Figura 1. Ensayos de variación de pH de: A) *L. acidophilus* con inulina grado molecular, B) *L. acidophilus* con inulina grado reactivo. C) *L. casei* con inulina grado molecular, D) *L. casei* con inulina grado reactivo.

en fermentaciones discontinuas, con un rango de variación generalmente entre 6,5 a 7<sup>12</sup>.

Se puede apreciar la factibilidad de masificación de las dos cepas a pH neutrales en un rango de 6,5 a 7,5, que coincide con el pH del medio de cultivo comercial MRS, disminuyendo el uso de soluciones reguladoras de pH.

### Ensayos de selección de inulina.

Las concentraciones de biomasa obtenidas fueron 45.9mg/L y 68.4mg/L de *L. acidophilus* y *L. casei* respectivamente a una concentración inicial de 45g/L de inulina grado molecular (figura 2). Este resultado sugiere que este tipo de inulina, al ser pura y no contener trazas de otros carbohidratos, permite ser aprovechada por las bacterias generando mayor crecimiento en más de una especie de *Lactobacillus*. El mejor prebiótico para a masificación de especies de *Lactobacillus* es la inulina, una investigación previa permito observar un crecimiento a las 24 horas de *L. casei* (8,48 +/- 0,05 UFCmL<sup>-1</sup>) y *L. acidophilus* (8,08 +/- 0,07 UFCmL<sup>-1</sup>) utilizando inulina grado molecular<sup>13</sup>. Se sugiere que la inulina es metabolizada por algunas especies de la misma forma debido a su pureza; en dicho estudio no existe diferencia significativa en la biomasa final de ambas cepas, a diferencia de los resultados presentados en este ensayo en particular donde *L. casei* alcanza una mayor concentración de biomasa, demostrando una mejor capacidad en metabolizar este fructooligosacarido, debido a produce enzimas apropiadas.

completa a pH 5-7, mientras que a pH bajos la inulinasa degrada moléculas mediante el rompimiento de enlaces de manera aleatoria<sup>15</sup>. Esto sugiere (según las condiciones de cultivo del presente estudio) que el método de acción de la inulinasa combinada con el pH, contribuyó en el crecimiento bacteriano, debido al rompimiento del fructooligosacárido en monómeros, facilitando procesos metabólicos.

Con inulina grado reactivo los resultados obtenidos fueron; 42.2mg/L de *L. acidophilus* a 50 g/L de FOS y 73.3mg/L de *L. casei* a 35g/L de FOS (figura 2). Los resultados demuestran que al usar inulina grado reactivo se obtiene mayor concentración de biomasa; esto se debe a que el reactivo no es 100% puro y contiene trazas de otros azúcares como glucosa, fructuosa y sacarosa. Lo cual sugiere que existe un mayor aprovechamiento de fuente de dichos azúcares más simples además de la inulina (especialmente por parte de *L. casei*), también se propone que las trazas activan de forma positiva la duplicación celular inicial.

Se ha propuesto mediante estudios que la inulina tiende a reducir tiempos de fermentación para la producción de metabolitos como el ácido láctico y promueve el crecimiento de probióticos como *L. casei*<sup>16</sup>. En este ensayo la inulina grado reactivo combinada con la cepa *L. casei* presentaron la mayor concentración celular, lo que concuerda con la literatura citada. Beneficiando económicamente a la posible producción de un probiótico a escala industrial en el país.

## Curvas de crecimiento previas a la optimización del proceso.

Para *L. acidophilus* la concentración de biomasa final fue de  $4,31 \times 10^{-1}$  g/L, obteniendo un crecimiento exponencial a partir de las seis horas de incubación hasta decima hora. Un estudio realizado determinó que a partir de la tercera hora existe un crecimiento exponencial de la bacteria hasta la hora doceava hora en un medio suplementado con suero de leche y 1% de inulina<sup>17</sup>; a diferencia de esta investigación donde la biomasa tiene un periodo de adaptación más prolongado y una fase exponencial más corta. La fase de adaptación fue más larga debido a que la degradación enzimática de inulina tarda a comparación de sustratos más simples, por consiguiente, la bacteria requiere de un gasto energético mayor. Sin embargo, otros estudios concuerdan con el presente trabajo concuerdan que la fase estacionaria de *L. acidophilus* se da a partir de la décima y onceava hora.

Se obtuvo una  $\mu$  de 0,78 h<sup>-1</sup> para *L. acidophilus* presentado un crecimiento exponencial a partir de las 4 horas de incubación hasta la doceava hora; los parámetros cinéticos se encuentran descritos en la tabla 1. Comparando con estudios propuestos<sup>18</sup>, donde se establece una  $\mu$  de 1,0 h<sup>-1</sup>, se debe tomar en cuenta que el estudio con el que se compara utilizó otras fuentes de carbono como lactosa y por lo tanto la velocidad de crecimiento es mayor, y se sugiere que procesos energéticos influyen en el metabolismo de moléculas complejas como la inulina, es decir el microorganismo consume inicialmente las moléculas más simples para dar paso al consumo de azúcares más complejos como la inulina. La ruta metabólica presentada en estudios previos, indica que el sistema de degradación de inulina es complejo, inicia con la conversión del FOS en monómeros de fructosa y glucosa hasta obtener productos finales como succinato, acetato y etanol<sup>19</sup>; este gasto energético es representativo e influye en la producción de biomasa incluyendo su velocidad de crecimiento.

En *L. casei* la concentración de biomasa final fue de  $5,58 \times 10^{-1}$  g/L, obteniendo un crecimiento exponencial a partir de las 4 horas de incubación hasta la doceava hora; además, se determinaron los parámetros cinéticos descritos en la tabla 1. Una investigación realizada<sup>20</sup>, determinó que la fase exponencial duró aproximadamente 10 horas, de manera similar a esta investigación. Adicionalmente, el estudio indica que la velocidad específica de crecimiento máxima para *Lactobacillus* utilizando glucosa como fuente de carbono es de 0,25 h<sup>-1</sup>; mientras que en el presente trabajo se obtuvo  $\mu_{max}$  de 0,307 h<sup>-1</sup>. Aunque la variación de velocidades no es grande, se sugiere que su diferencia se debe al uso de sustratos diferentes y la concentración inicial del inóculo.

## Optimización de concentración de inulina y pH.

Parámetro	Fórmula	Resultado <i>L. acidophilus</i>	Resultado <i>L. casei</i>
Velocidad de crecimiento	$\mu = \frac{\ln X_f - \ln X_0}{\Delta t}$	0,196 h <sup>-1</sup>	0,076 h <sup>-1</sup>
Velocidad máxima de crecimiento	$\mu_{max} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$	0,78 h <sup>-1</sup>	0,307 h <sup>-1</sup>
Tiempo de duplicación	$td = \frac{\ln 2}{\mu}$	3,55 h	9,17 h
Productividad global	$Y_{global} = \frac{X_f - X_0}{t_f - t_0}$	0,033 g/Lh	0,038 g/Lh
Productividad máxima	$Y_{max} = \frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1}$	0,163 g/Lh	0,067 g/Lh

Tabla 1. Parámetros cinéticos de *L. acidophilus* y *L. casei*.

La superficie de respuesta generada para el DCCR de *L. acidophilus* con inulina grado molecular (ver figura 3), se ajustó en un 94,93% al modelo matemático propuesto y el mejor ren-

dimiento ( $Yx/s$ ) alcanzado en el ensayo fue de 0,59 (g/g) en el tratamiento de pH 6,5 y 31g/L de inulina grado molecular. Existió significancia estadística para las variables cuadráticas; al contrario de la interacción de las variables y su efecto lineal. Lo que sugiere un buen ajuste al modelo ya que los términos cuadráticos proveen la curvatura en la superficie; además estos analizan cada factor con los resultados promedios, obteniendo así una ecuación de segundo orden.<sup>21</sup>

La superficie de respuesta generada en el DCCR de *L. acidophilus* con inulina grado reactivo (ver figura 3), se ajustó al modelo matemático a un 70,78%; el rendimiento ( $Yx/s$ ) más alto alcanzado en este ensayo es de 0,11 g/g en un medio de pH 8 y 40g/L de inulina grado reactivo. No existió significancia estadística en la combinación de variables ni en su expresión lineal o cuadrática, lo que implica que el modelo matemático propuesto no es el más adecuado, y a futuro se debe proponer más ajustes en los niveles de las variables del diseño experimental.

Se puede apreciar en las figuras de superficie de respuesta (figura 3) que los puntos extremos de las variables son posibles puntos óptimos para el crecimiento de *L. acidophilus* con inulina grado molecular. Mientras que el diseño de *L. acidophilus* con inulina grado reactivo demostró que el mejor crecimiento bacteriano se obtiene a menores porcentajes de inulina; el rango de pH es muy amplio por lo que no existió diferencia en el crecimiento con respecto a esta variable.

La superficie de respuesta *L. casei* con inulina grado molecular (ver figura 3), se ajustó en un 64,57% al modelo matemático. El mejor rendimiento ( $Yx/s$ ) alcanzado en el ensayo fue de 0,26 g/g en el medio suplementado con 31g/L de inulina grado molecular y ajustado a un pH de 7. No existió significancia estadística tanto de los efectos cuadráticos como los efectos lineales de las variables, así en la combinación de las mismas. Esto da lugar a la interpretación de que el diseño no poseía valores significativos de ambas variables con respecto al crecimiento de *L. casei*.

La superficie de respuesta de *L. casei* con inulina grado reactivo (ver figura 3), se ajustó al modelo matemático en un 99,92%, lo cual sugiere la optimización del medio de cultivo a pH de 7,465 y a 43,1g/L de inulina para la masificación de la bacteria (datos obtenidos a partir de la ecuación dada por el modelo). También se obtuvo un mejor rendimiento ( $Yx/s$ ) en cuanto al consumo de sustrato de 0,24 (g/g) en el tratamiento de pH 7 y 2,5g/L de inulina grado reactivo. Comparando con un estudio<sup>22</sup>, se determinó que la bacteria crece mejor en pH más neutrales (6,5 - 7); contrastando con los resultados obtenidos, concuerdan los valores de rendimientos y los puntos óptimos de pH que arroja el experimento.

## Validación del medio de cultivo optimizado

Para los ensayos de validación del medio optimizado se determinaron las variables a partir de la formula dada por el modelo matemático (ecuación 1) de la siguiente manera:

$$Biomasa \text{ gL}^{-1} = 7,0167x + 0,7712y - 0,4741x^2 - 0,129y^2 + 0,0166xy - 27,0192$$

$$x_1 = \frac{-ex_2 - a}{2c} = 7,465 \text{ pH} \quad x_2 = \frac{ae - 2bc}{4dc - e^2}$$

$$= 43,1 \text{ g/L inulina grado reactivo}$$

Los ensayos de validación del diseño experimental que implica la inoculación de *L. casei* en un medio regulado a pH 7,5 y a 43,1g/L de inulina grado reactivo; presentaron rendimientos ( $Yx/s$ ) superiores a 0,55 (6,8 g/g), esto indica el aprovechamiento de inulina por parte de bacteria. Adicionalmente se alcanzó una concentración final de biomasa de 215 mg/L a las 72 horas de incubación en tubo de ensayo.

El medio ideal sugerido permitió obtener valores superiores tanto de velocidad específica de crecimiento ( $2,71 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) como de rendimientos de consumo de sustrato y productividad global

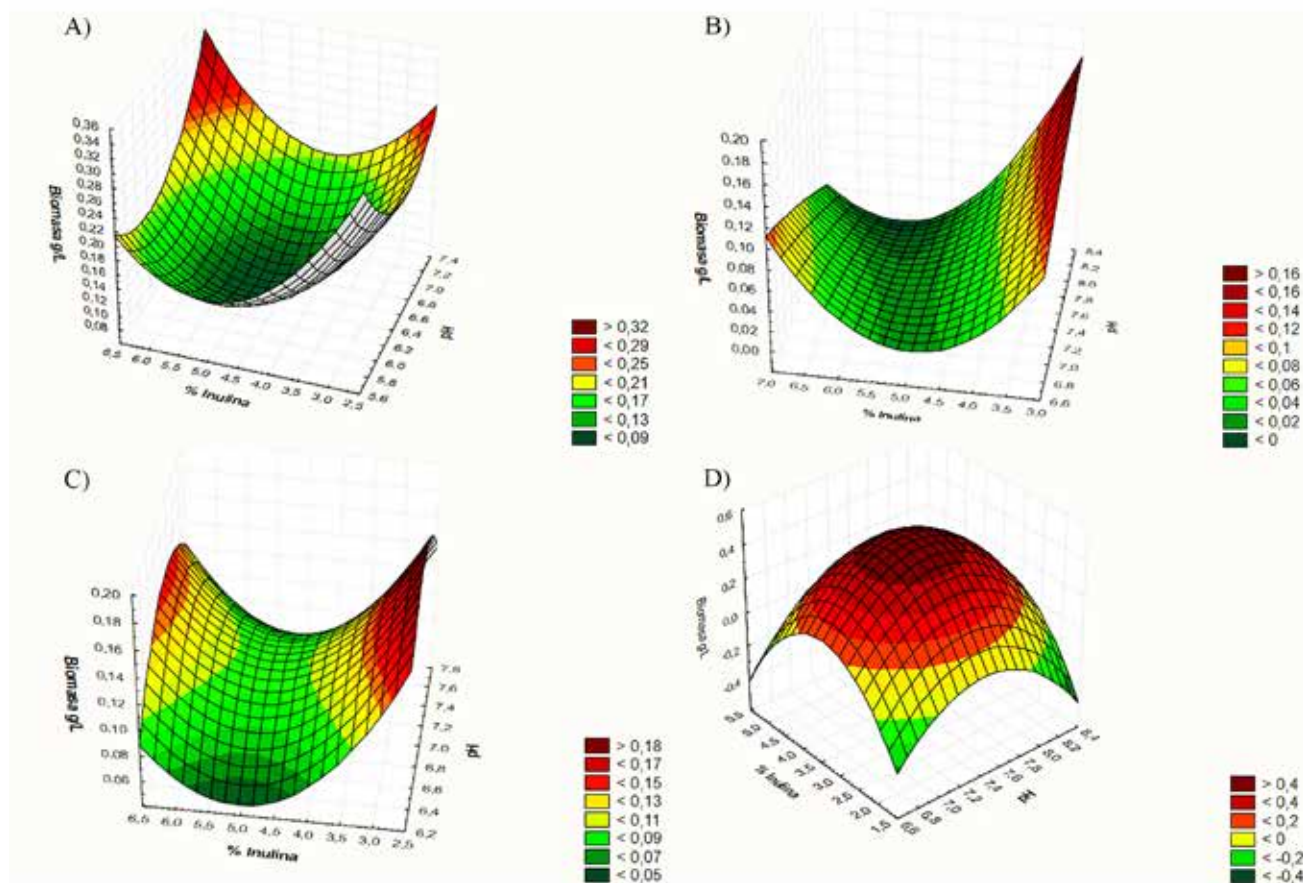


Figura 3. Gráficos de superficie de respuesta correspondientes a cada diseño: A) *L. acidophilus* con inulina grado molecular. B) *L. acidophilus* con inulina grado reactivo. C) *L. casei* con inulina grado molecular. D) *L. casei* con inulina grado reactivo

( $\mu = 0,68 \text{ g/g y } 7,75 \times 10^{-4} \text{ g/Lh}$ ), presentado mejores resultados que los obtenidos a lo largo de la investigación.

## CONCLUSIONES

Se equilibró el nivel de pH del medio mediante el uso de tampones, esto contribuyó a disminuir errores entre réplicas y unidades experimentales. El rango de pH estudiado fue muy amplio, lo cual dificultó el proceso de optimización de este parámetro para cada cepa; sin embargo, se obtuvo un medio ideal para el crecimiento de *L. casei*, que existe una significancia estadística de pH tanto en su expresión cuadrática como lineal. Además los resultados obtenidos en la validación del medio se asemejan a los propuestos por el modelo matemático (concentraciones de biomasa mayores a 0,4 g/L).

Los porcentajes ideales propuestos para el medio masificante de ambos tipos de inulina varían. Esto se debe a que existe una diferencia en la pureza de los prebióticos, influenciando en el crecimiento de las cepas; los resultados de selección del FOS demuestran que el uso de inulina grado reactivo genera mayor concentración de biomasa a comparación de inulina grado molecular. Es por esto que el medio óptimo propuesto utiliza dicha inulina, la cual contiene trazas de otras fuentes de carbono para el crecimiento de *L. casei*. Pese a que ambas cepas pertenecen al mismo género, se pudo visualizar diferencia significativa en el crecimiento y desarrollo de cada especie. Aunque los resultados se asemejen, su comportamiento es distinto.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la carrera de Ingeniería en Biotecnología, representada por la Coordinadora PhD. Vivian More-

ra, por el apoyo prestado a lo largo del proyecto de investigación desarrollado en las instalaciones del Laboratorio LQ3 de la Universidad De Las Américas. Adicionalmente se agradece el apoyo de los ayudantes de laboratorio: Javier Panchano, Cinthia Tovar y Alejandro Vega, estudiantes de la carrera.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chang, C., Ho-Keun, K., Ji-Sun, H., Jung-Eun, K., Sin, I. (2012). Prophylactic Effect of Probiotics on the Development of Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis, Revista A Peer Reviewed, Open Access Journal, 7(12), 1-5.
- Sanders, M., Akkermans, L., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J., Hörmannspurger, G., Huys, G., Lutgendorff, F., Mack, D., Phothirath, P., Aguilar, G., Vaughan, E. (2010). Safety assessment of probiotics for human use, Revista gut microbes, 1(3), 164-179.
- Papadimitriou, K, Zoumpopoulou, G, Foligné, B, Alexandraki, V, Kazou, M, Pot, B, Tsakalidou, E, (2015). Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches, Revista Frontiers in Microbiology, 6(58), 1-4.
- Vasiee, A., Yazdi, F., Mortazavi, A., Edalatian, M. (2014). Isolation, identification and characterization of probiotic Lactobacilli spp. from Tarkhineh, Revista International Food Research Journal, 21(6), 2487-2490.
- Viela, S, Barbosa, J, Rossoni, R, Santos, J, Prata, M., Anbinder, A., Jorge, A., Junqueira, J. (2015). *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*, Revista Virulence, 6(1), 29-33.
- Tiptiri-Kourpeti, A., Spyridopoulou, K., Santarmaki, V., Aindelis, G., Tompoulidou, E., Lamprianidou, E., Saxami, G., Ypsilantis, P., Lam-



- pri, E., Simopoulos, C., Kotsianidis, I., Galanis, A., Kourkoutas, Y., Dimitrellou, D., Chlichlia, K. (2016). Lactobacillus casei Exerts Anti-Proliferative Effects Accompanied by Apoptotic Cell Death and Up-Regulation of TRAIL in Colon Carcinoma Cells, *Revista PLOS*, 11(2), 3-7.
7. Vargas, C., Montañez, J. (2009). Obtención de insumos de interés industrial a partir de las fructanas de agave mezcalero potosino (Agave salmiana), (tesis de maestría en ciencias de producción agrícola sustentable), Instituto Politécnico Nacional de México.
  8. ATCC, (s. f). ATCC Medium: 416 Lactobacillus MRS Agar/Caldo, recuperado el 20 de marzo del 2016, de <http://www.atcc.org/~media/39839AC0CB884212A57DBF6936371D91.ashx>
  9. Foye, O., Huang, I., Chiou, C., Walker, W., Ning, H. (2014). Early administration of probiotic Lactobacillus acidophilus and/or prebiotic inulin attenuates pathogen-mediated intestinal inflammation and Smad 7 cell signaling, *Revista FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(3), 467-472.
  10. Chramostová, J., Mošnová, R., Lisová, I., Pešek, E., Drbohlav, J., Němečková, I. (2014). Influence of Cultivation Conditions on the Growth of Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium sp., and Streptococcus thermophilus, and on the Production of Organic Acids in Fermented Milks, *Revista Czech Journal of Food and Science*, 32(5), 422-429.
  11. Meena, G., Kumar, N., Majumdar, G., Banerjee, R., Meena, P., Yadav, V. (2014). Growth Characteristics Modeling of Lactobacillus acidophilus using RSM and ANN, *Revista Braz. Arch. Biol. Technol*, 57(1), 15-21.
  12. Velásquez, J., Giraldo, G., Padillas, L. (2012). Viabilidad de Lactobacillus casei ssp casei ATCC 393 cultivado en suero de leche clarificado en un proceso de fermentación discontinuo, *Revista Vitae*, 19(1), 207-209.
  13. Kunová, G., Rada, V., Lisová, I., Ročková, S., Vlková, E. (2011). In vitro Fermentability of Prebiotic Oligosaccharides by Lactobacilli, *Revista Czech Journal of Food and Science*, 29, 49-53.
  14. Xian-Yang, G., Quian, H., Zhang, W., (2010), Enhancement of L-Lactic Acid Production in Lactobacillus casei from Jerusalem Artichoke Tubers by Kinetic Optimization and Citrate Metabolism, *Revista Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20 (1), 101-109.
  15. Abdullah, N., Aly, M., Ibrahim, A., (2003), Studies On Possible Activation Of Microbial Inulinase Production Using Gamma Radiation Under Solid State Fermentation, (tesis en licenciatura en ciencias de farmacología), Universidad del Cairo-Egipto.
  16. Rodríguez, D., Rocha-Santos, T., Pereira, C., Gomes, A., Malcata, X., Freitas, A. (2011). The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices, *Revista LWT-Food Science and Technology*, 44(1), 100-107.
  17. Olson, D., Aryana, K. (2012). Effect of Prebiotics on Lactobacillus acidophilus Growth and Resulting pH Changes in Skim Milk and a Model Peptone System, *Revista Microbial & Biochemical Technology*, 4(5), 121-124.
  18. Ahn, Y., Lim, K., Ryu, J., Kang, D., Ham, J., Jang, Y., Kim, H. (2002). Characterization of Lactobacillus acidophilus Isolated from Piglets and Chicken, *Revista Asian-Aust. J. Anim. Sci*, 15(12), 1790-1796.
  19. Sridhar, J., Eiteman, M., Wiegel, J. (2000). Elucidation of Enzymes in Fermentation Pathways Used by Clostridium thermosuccino genes Growing on Inulin, *Revista Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 246-250.
  20. Pak, D., Muthaiyan, A., Story, R., O'Bryan, C., Lee, S., Crandall, P., Ricke, S. (2013). Fermentative Capacity of Three Strains of Lactobacillus Using Different Sources of Carbohydrates: In Vitro Evaluation of Symbiotic Effects, Resistance and Tolerance to Bile and Gastric Juices, *Revista Journal of food research*, 2(1), 158-163.
  21. Zan, T., Ginebra, J. (2006). Principios de metodología de superficie de respuesta para modelos logísticos, (tesis Doctoral del departamento de estadística e investigación operativa), Universitat Politècnica de Catalunya Barcelona España.
  22. Nezhard, M., Stenzel, D., Britz, M. (2010). Effect of growth at low pH on the cell surface properties of a typical strain of Lactobacillus casei group, *Revista Iranian Journal of Microbiology*, 2(3), 147-153.

Recibido: enero 2017

Aprobado: febrero 2017

# SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOALS



Revista Bionatura supports the Sustainable Development Goals

## INVESTIGACIÓN

## Identificación y cuantificación de *Salmonella* sp. y ADNr 16S bacteriano mediante PCR en tiempo real en muestras de alimentos

Identification and quantification of *Salmonella* sp. and bacterial DNAr 16S by Real-Time PCR in food samples

Viviana Chiluisa-Utreras<sup>1</sup>; Andrea Echeverría<sup>1</sup>

DOI. 10.21931/RB/2017.02.01.5

## RESUMEN

Utilizando la técnica PCR en Tiempo Real, que es más sensible, específica y rápida que las técnicas convencionales, se ha logrado la determinación de algunos patógenos alimentarios de forma inmediata como por ejemplo: *Salmonella* sp.; que en pequeñas cantidades es capaz de causar enfermedades gastrointestinales resultando riesgoso para la salud del consumidor, la ingesta de alimentos sin control sanitario. La presente investigación se realizó con el objetivo principal de identificar y cuantificar mediante PCR en Tiempo Real la presencia de *Salmonella* sp. y ADNr 16S bacteriano en alimentos de establecimientos cercanos a la Universidad Politécnica Salesiana. Se tomaron muestras de diez locales y se analizaron por triplicado para posteriormente aplicar los análisis estadísticos pertinentes. Como resultado, utilizando la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis se detectó en el 100% de las muestras la presencia de la secuencia de ADNr 16S, que mostró significancia estadística; mientras que la evaluación de la secuencia SPI-1, un gen de virulencia para *Salmonella* sp., el 6,7% de casos positivos y se reveló que no existe diferencia significativa. Mediante las curvas estándar de cada secuencia, se logró cuantificar la carga bacteriana para 16S en un promedio de 51 ug/mL y para el caso de *Salmonella* sp. una concentración en el rango de 0,766 a 0,0170 ug/mL.

**Palabras clave:** *Salmonella* sp., ADNr 16S bacteriano, PCR en Tiempo Real, alimentos.

## ABSTRACT

By using the real-time PCR technique, which is more sensitive, specific and faster than conventional techniques, the determination of some food pathogenic microorganisms has been achieved immediately, as in the case of *Salmonella* sp.; which in minimal amounts is capable of causing gastrointestinal diseases resulting dangerous to the health of the consumer, the intake of food without health control. The present study was carried out with the principal objective of identifying and quantifying by Real Time PCR the presence of *Salmonella* sp. and 16S bacterial rDNA in samples of food adjacent to the Salesian Polytechnic University. About ten establishments were investigated and samples were analyzed in triplicate for subsequent statistical analyzes. As a result, the presence of 16S bacterial rDNA was detected in 100% of the samples using Kruskal-Wallis non-parametric statistical test, which showed statistical significance; while the evaluation of the SPI-1 sequence, a virulence gene for *Salmonella* sp., 6.7% of positive cases and it was revealed that there is no significant difference. By means of the standard curves of each sequence, the bacterial load for 16S was quantified in an average of 51 ug/mL and in the case of *Salmonella* sp. A concentration in the range of 0.766 to 0.0170 ug/mL.

**Key words:** *Salmonella* sp., bacterial 16S rDNA, real-time PCR, foods.

## Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos son una gran amenaza a la salud pública en todo el mundo y son una causa importante de mortalidad<sup>1</sup>. Aunque muchas son leves y se asocian a síntomas gastrointestinales básicos, en algunas ocasiones las enfermedades transmitidas por agua y alimentos (ETA's) pueden resultar mucho más peligrosas para la vida de los consumidores en edades tempranas<sup>2</sup>.

El género *Salmonella* constituye uno de los grupos de microorganismos patógenos más relevantes en el mundo, provocando serias enfermedades gastroenteríticas en humanos y animales<sup>3</sup>. La principal fuente de contagio es la ingesta de comida infectada; algunos productos pueden ser carnes, aves, lácteos, huevos y verduras mal lavadas y preparadas; ya que un incorrecto procesamiento contamina los alimentos<sup>4</sup>.

Por su parte, ADNr 16S bacteriano es una secuencia ampliamente utilizada como un marcador evolutivo que se encuentra presente en todas las células bacterianas; sirve para rastrear carga bacteriana por ejemplo en alimentos y agua; es un gen constitutivo debido a que se presenta consecutivamente y tiene un tamaño adecuado para realizar análisis, a más de ser fácil de aislar y caracterizar<sup>5</sup>.

La presente investigación muestra la carga bacteriana y la presencia de *Salmonella* sp. en muestras de alimentos utilizando la técnica PCR en Tiempo Real como una herramienta sensible, específica y rápida para la determinación de patógenos hasta en mínimas cantidades.

<sup>1</sup> Laboratorios de Ciencias de la Vida CIVABI, Universidad Politécnica Salesiana, Quito – Ecuador.

Correspondence: vchiluisa@ups.edu.ec

## Materiales y Métodos

### Localización y tamaño de la muestra:

El presente estudio se llevó a cabo en los Laboratorios de Ciencias de la Vida (CIVABI) de la Universidad Politécnica Salesiana Quito, Sede El Girón. Las muestras de alimento fueron tres de diez locales adyacentes a la Universidad.

### Recolección de Muestras Para Análisis:

“La recolección de las muestras de alimentos se realizó en base a la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1529-2:99 donde se encuentra definida la metodología de muestreo para alimentos de comida rápida”<sup>6</sup>

El almacenamiento se lo realizó en conformidad con la norma para continuar con un pre enriquecimiento de las muestras en agua peptonada, lo cual permite conservar las bacterias en óptimas condiciones para los análisis.

### Extracción de ADN de las muestras:

Utilizando High Pure PCR Template Preparation Kit, se agregó en un tubo eppendorf de 1,5 mL libre de nucleasas, 200µL del material de muestra, para continuar con las indicaciones del fabricante.

Se transfirió la muestra a un tubo de purificación con su filtro específico y se realizó una centrifugación por un minuto a 8000 x g. Para terminar, se agregó 200 µL de buffer de elución precalentado a 70°C al tubo de filtrado y se almacenó a -20°C para los análisis posteriores.<sup>7</sup>

Para la identificación de ADN se utilizó el equipo LightCycler® 2.0 de Roche, con los kits de amplificación de ADN en Tiempo Real.

### Técnica PCR en Tiempo Real:

Posterior a la purificación del ADN, se procedió a la aplicación de la técnica de PCR, se colocaron 5 µL de la muestra y se adicionó 10,2 µL de Agua grado Biología Molecular, 0,4 µL del Primer FW, 0,4 µL del Primer RW y 4µL de la Master Mix Sybr Green I (ya adicionada la enzima) en cada capilar con capacidad de 20 µL, se centrifuga a 3.000 rpm durante 5 segundos y se coloca en el carrusel del equipo para realizar la prueba en Tiempo Real.

Los resultados de la amplificación se compararon con un control positivo representado por un estándar bacteriano ATCC, *E. coli* para determinar ADNr 16S y una cepa certificada de *Salmonella* para determinar *Salmonella sp.*, cultivados en el laboratorio de Microbiología, finalmente se utilizó un control negativo: 5 µL de agua ultra-estéril.

Establecimientos*	ADNr 16S <sup>†</sup>	Repeticiones
A	1,98	3
B	5,64	2
C	1,56	2
D	1,09	2
E	1,01	2
F	1,53	2
G	5,94	2
H	1,98	2
I	0,15	2
J	51	3

\* No se pueden reportar los nombres de los establecimientos  
<sup>†</sup>Rango promedio de la concentración de ADNr 16S bacteriano ug/ml

**Tabla 1.** Casos positivos de ADNr 16S bacteriano en ug/ml por establecimiento

La técnica de PCR en Tiempo Real se llevó a cabo según el protocolo de LC FS DNA Master PLUS HY-Pb, 96 react. LightCycler (Roche Diagnostics), el cual consiste en 40 ciclos compuestos por cuatro pasos: Desnaturalización: 95°C, 10 min; Aliñamiento: 62°C, 10sg; Melting: 95°C, 0; Enfriado: 40°C, 30sg.

Se realizaron dos Curvas Estándar para cuantificar tanto *Salmonella sp.* y ADNr 16S utilizando muestras con concentraciones conocidas que fueron previamente cuantificadas en el equipo fluorimétrico: Qubit. Los datos fueron incorporados al software del LightCycler, para así poder cuantificar cada una de las muestras desconocidas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### Cuantificación mediante PCR en tiempo real de ADNr 16S en las muestras de alimento

De cada una de las muestras de hamburguesa analizadas en esta investigación, se logró detectar mediante la técnica un total de 100% de casos positivos para esta secuencia.

En la Tabla 1 se observa que el establecimiento J presentó la mayor cantidad de concentración de ADNr 16S bacteriano frente a los demás lugares, se cree que esto se debió a que el lugar de expendió se ubicaba en un sitio inapropiado en la vía pública siendo así vulnerable a los patógenos, toxinas o sustancias químicas a más del inadecuado aseo de los manipuladores, la limpieza y la desinfección de insumos y materiales empleados en la preparación de los alimentos, constituyeron factores determinantes que generaron en este análisis un escenario propicio para la contaminación y la propagación bacteriana en el alimento.

Los datos obtenidos de la concentración promedio de la secuencia ADNr 16S fueron analizados mediante el programa estadístico Infostat y SPSS v.17, expresando un resultado positivo, utilizando la prueba estadística de Kruskal-Wallis de análisis de datos no paramétricos, se determinó un H igual a 10,05 lo que determina que si existen diferencias significativas, lo cual permite aceptar la hipótesis alternativa en la que se esperaba que en al menos uno de los establecimientos exista gran carga bacteriana presente en el alimento<sup>8</sup>.

Según el Instituto Ecuatoriano de Normalización<sup>9</sup>, para alimentos preparados, el límite permisible para identificar el nivel aceptable de buena calidad del alimento, debe ser < 3 ufc/g de alimento. Sin embargo, no todos los establecimientos de comida rápida cumplen con esta normativa, como lo menciona Chiluisa-Utreras<sup>6</sup>, en donde se realizó un estudio microbiológico y molecular constatando la alta carga microbiana en los alimentos analizados.

Tras el análisis de las muestras de alimentos, se detectó que existen muestras positivas, como se presenta en la Figura 1, la interpretación de los resultados se llevó a cabo mediante la curva de amplificación, con el punto denominado Cp, éste indica el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor del umbral presentando picos con fragmentos distintos de ADN que se habían producido en la reacción.

Así, podemos identificar algunas de las curvas obtenidas de cada una de las muestras de alimento para la detección y cuantificación de la secuencia ADNr 16S, en donde la fluorescencia es detectada desde el ciclo 25 con valores altos de concentración, con lo que se afirma que se tiene una carga bacteriana importante debido a que la relación de los ciclos y la carga bacteriana es inversamente proporcional, un Cp bajo presentará concentraciones altas, determinándose de esta manera la presencia y cantidad del patógeno.



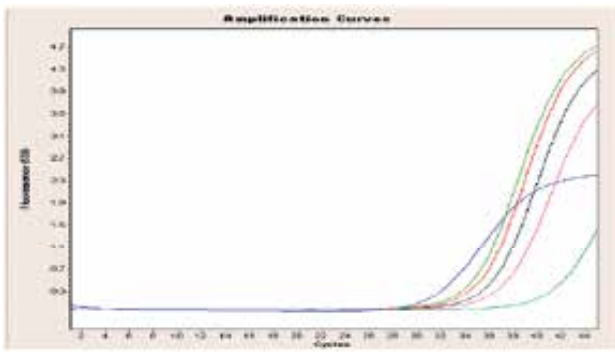


Figura 1. Curvas de amplificación de ADNr 16S bacteriano: fluorescencia vs ciclos

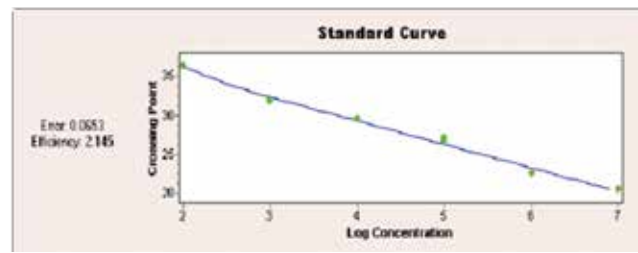


Figura 2. Curva Estándar obtenida para la cuantificación de *Salmonella* en muestras de alimentos.

## Cuantificación mediante PCR en tiempo real de *Salmonella* sp. en las muestras de alimento

En la Figura 2 se adjunta una de las curvas estándar que se realizó para esta investigación, ésta es generada para la cuantificación de *Salmonella* en muestras de alimentos; la eficiencia de esta curva es de 2.145 rango que se encuentra dentro de los parámetros aceptables, además presenta un error bajo de 0.0653 puntos es decir cercano a cero, que nos da la certeza en los resultados obtenidos. La cuantificación de ADN de *Salmonella* sp. por medio de la PCR en tiempo real con la curva de calibración permitió determinar las concentraciones en cada muestra analizada. En la Tabla 2 se muestran los rangos promedios para *Salmonella* sp. en ug/mL por cada uno de los establecimientos:

Los resultados para las concentraciones de *Salmonella* que se muestran en la Tabla 2 son cero para la mayoría de los establecimientos analizados, sin embargo una repetición de los establecimientos D y E, presentaron resultados positivos con una concentración de 0,766 y 0,0170 ug/mL; por lo que se logró determinar a través del método un total del 6,7 % de casos positivos, que analizados por los programas estadísticos expresan un resultado negativo utilizando Kruskal-Wallis; se determinó un H igual a 1,56 que determina que no existe diferencia significativa, lo que permite aceptar la hipótesis nula en el que ningún establecimiento presenta carga importante para *Salmonella* en el alimento.

Establecimientos*	ADNr 16S <sup>+</sup>	Repeticiones
A	1,98	3
B	5,64	2
C	1,56	2
D	1,09	2
E	1,01	2
F	1,53	2
G	5,94	2
H	1,98	2
I	0,15	2
J	51	3

\* No se pueden reportar los nombres de los establecimientos.  
<sup>+</sup>Rango promedio de la concentración de ADNr 16S bacteriano ug/ml

Tabla 2. Concentraciones promedio de *Salmonella* sp. en ug/ml

*Salmonella* sp. es considerada una bacteria patógena que puede causar enfermedades gastrointestinales<sup>10</sup>, su presencia en alimentos debe ser nula, sin embargo, la mala manipulación de alimentos y la poca higiene con la que se los procesa tiene gran incidencia<sup>11</sup>.

El resultado de una corrida de PCR en tiempo real se visualiza en un gráfico de amplificación. En este caso, los resultados de la amplificación de las corridas de las muestras de alimento son negativas, lo que significa que el valor del umbral no fue superado respecto al control<sup>12</sup>.

Aplicar esta técnica molecular para la determinación de bacterias causantes de ETA's, presenta varias ventajas sobre los análisis microbiológicos. Como lo reporta Chiluisa-Utreras<sup>6</sup>, la PCR en tiempo real al ser un espectrofluorómetro presenta mayor precisión ya que detecta mínimas cantidades bacterianas, mayor sensibilidad por los fluorocromos que utiliza, especificidad por los primers, y óptima capacidad para procesar grandes cantidades de muestras en poco tiempo ya que el proceso tarda en promedio 24 horas en contraste con el método convencional; además hay que destacar que los métodos moleculares presentan menor cantidad de contaminación que los métodos microbiológicos.

## Conclusiones y Recomendaciones

En conclusión, los resultados obtenidos permiten determinar que la técnica molecular presenta muchas más ventajas para la detección rápida y precisa de patógenos en alimentos y sobre todo para el análisis de la distribución de productos inocuos para los consumidores<sup>13</sup>.

El desarrollo de métodos moleculares tanto para la detección e identificación de microorganismos patógenos han proporcionado nuevas herramientas confiables para determinar en menor tiempo el riesgo de infección por patógenos en alimentos, por lo que es considerada un instrumento poderoso en el diagnóstico microbiológico<sup>14</sup>.

Los resultados de esta investigación confirman un alto índice de patógenos en el alimento analizado, la hamburguesa, el cual corresponde a varios establecimientos tanto ambulantes como restaurantes, demostrando que estos lugares no cuentan con una norma de higiene establecida que les permita tener noción de la inocuidad que se necesita para expender un alimento saludable al consumidor<sup>15</sup>.

Es importante que los organismos de control sanitario realicen inspecciones periódicas a los establecimientos con la finalidad de prevenir enfermedades transmitidas por alimentos contaminados por patógenos, puesto que los mismos están dirigidos a personas jóvenes que buscan alimentos de rápido acceso y consumo<sup>16</sup>.

Finalmente, se recomienda seguir en la investigación con patógenos alimentarios ya que al obtener un 100% de casos positivos para la secuencia ADNr 16S se analiza que a pesar de no encontrarse mayor carga de *Salmonella*, estamos al descubrimiento de cualquier otro tipo de bacterias que podrían generar ETA's<sup>17</sup>.

## Agradecimientos

A la MSc. Ivonne Vaca por su aporte en el análisis de datos.

## Referencias:

1. Ministerio de Salud Pública. (2012). Normas Del Sistema Integrado De Vigilancia Epidemiológica Del Ecuador (Sive). En línea: <https://aplicaciones.msp.gov.ec/salud/archivosdigitales/documentosDIRECCIONES/dnn/archivos/NORMA%20sive%208-04-2013.pdf> Consulta: 15 de Septiembre 2014.
2. Arenas, L.; Rodas, A.; Narváez, C.; Jerez, N.; Huerta, N.; Giuffrida, M. y Uzcátegui, S. (2009). Calidad microbiológica de las carnes y de los alimentos. AGROTECNICO No. 25. Pág. 44.
3. Dirección Provincial de Salud de Pichincha. (2012). Reporte de los casos de Enfermedades Transmitidas por Agua y Alimentos en la Provincia de Pichincha durante 2011 y 2012. Quito.
4. Jiménez, J., Muñoz, A., & Delgado, D. (2014). Fiebre tifoidea y otras infecciones por Salmonella. México: Facultad de Medicina Universidad Autónoma de México.
5. Clarridge JE. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clin Microbiol. doi: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.
6. Chiluisa-Utreras V., J. Coba y A. Echeverría. (2014). Determinación por PCR en Tiempo Real de Escherichia coli en muestras de comida rápida. La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 19(1): 44-50. ISSN: 1390-3799.
7. Roche Diagnostics (2010). LightCycler® foodproof Salmonella sp. detection kit. GmbH, Mannheim, Germany.
8. Sánchez-Otero. 2013. Introducción a la estadística en las ciencias biológicas. Quito - Ecuador.
9. Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN) Límite permisibles para alimentos de Salmonella sp. y carga microbiana. En Línea: <http://www.normalizacion.gob.ec/> Consulta 12 de Septiembre 2014.
10. Lupien, J., & Flores, M. (2002). Sistemas de Calidad e Inocuidad de los Alimentos. Manual de capacitación sobre higiene de los alimentos y sobre el sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC). Roma: Grupo Editorial, Dirección de Información de la FAO.
11. Rodríguez, R. (2011). Programa Nacional para la Vigilancia, Control y Erradicación de Salmonella en Aves de Ecuador. Quito: Editorial Universitaria.
12. Edwards, K.J. (2004). Performing Real-Time PCR. In: Real-Time PCR; An Essential Guide. K.J.Edwards et al., editors. Horizon Bioscience.Wymondham, p. 71-84.
13. Yáñez, E., Máttar, S., & Durango, A. (2008). Determinación de Salmonella sp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. Bogotá: Biblioteca Nacional de Salud "José Celestino Mutis".
14. Valasek, M. A. and J. J. Repa (2005). "The power of real-time PCR." Adv Physiol Educ29(3): 151-159.
15. Bustin, S.A. (2005). Real-Time PCR. In: Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics M.Podda & J.Fuchs, editors. Marcel Dekker. New York, p. 1131-1135.
16. Ortiz, R.; Gutiérrez, R.; Vega, S.; Díaz, G. y Schettino, B. (2008). Contaminación de los alimentos. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. México. Pág. 7. Publicado en revista virtual RECITELA - v.8 n.1.
17. Chan, O, Wolf, M., Hepperle, D. and Casper, P. (2002). Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. African J. of Biotechnology 2(12):710-713. En línea: <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/14906/58650>.

Recibido: enero 2017

Aprobado: febrero 2017



All for pharmaceutical industry - from lab to clinical trials  
**clinical Biotec**

<http://clinicalbiotec.com/>

<https://twitter.com/clinicalbiotec>

<https://www.facebook.com/bioclinal/>

## INVESTIGACIÓN

## Elaboration of a bioprepared with probiotic effect from a mixed culture of lactic bacteria and yeasts

### Elaboración de un biopreparado con efecto probiótico a partir de un cultivo mixto de bacterias lácticas y levaduras

Miranda Yuquilema J.E.<sup>1\*</sup>, Marín Cárdenas A<sup>1</sup>, Baño Ayala D<sup>2</sup>.

DOI. 10.21931/RB/2017.02.01.6

#### ABSTRACT

The use of bacteria as beneficial biological agents being used as food ingredients or as active components of food supplements dates back to the early 1900s. The objective of this study was elaboration a bioprepared whit probiotic effect from a mixed culture of lactic bacteria and yeasts. The bioprepared substrate contained 57.5% orange vinasse and 30% Sugar cane molasses. The strains *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *Kluyveromyces fragilis* L-4uclv and *Saccharomyces cerevisiae*, it was grown in sterilized milk. Were in oculated 12.5% in the substratum molasses-vinasse. Finally incubated during 24h at 37°C. The results of the biopreparation was 18% Dry matter, 3.3% ash, 19% Crude protein, 12% True protein and 3.2% Ether extract. The microorganism counts were 9x10<sup>9</sup> cfu/mL, 0.75% organic acids and 95% viability was. Color was, in the CIELab\* system: L\*31.85, a\*11.48, b\*24.52, C\*27.08 and H64.91, similar to the HTML code #61382B. pH initial was 4.4 and after 72h it was established in 3.86 the value maintained for 90 d, at a temperature 12 ±2°C. There were no differences in physical characteristics. The parameters bromatology and microbiology there was difference (P<0.05). The results showed that by-products as vinasse and molasses are good and economic substrates feed for probiotic grow and obtain an acceptable probiotic for animal feed.

**Key words:** Bioprepared, Mixed crop, Molasses, Probiotic, Vinasse.

#### RESUMEN

El uso de microorganismos benéficos adicionados en la alimentación viene desarrollándose desde los años 1900. El presente trabajo tiene el objetivo de elaborar un biopreparado a partir de un cultivo mixto de bacterias lácticas y levaduras. El sustrato del biopreparado contenía 57,5% vinaza de naranja y 30% melaza de caña de azúcar. Las cepas *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *Kluyveromyces fragilis* L-4uclv y *Saccharomyces cerevisiae* se cultivó en leche esterilizada. Posteriormente se inoculó el 12,5% en el sustrato melaza-vinaza. Finalmente se incubó a 37°C por 24 h. Los resultados del biopreparado fue 18% Materia seca, 3,3% Ceniza, 19% Proteína cruda, 12% Proteína verdadera y 3,2% Extracto etéreo. La concentración microbiana 9x10<sup>9</sup> UFC/mL, 0,75% ácido láctico y 95% viabilidad. Color mediante CIELab\* System: L\*31,85; a\*11,48; b\*24,52; C\*27,08 y H64,91 y similar al código HTML # 61382B. El pH inicial del biopreparado fue 4,4, transcurrido 72 h se estabilizó en 3,86 manteniendo ese valor hasta 90 días pos elaborado a 12 ±2°C. No hubo diferencia en las características físicas, pero si se mostraron diferencias (P<0,05) en los parámetros bromatológicos y microbiológicos. Los resultados mostraron que los subproductos agroindustriales como la vinaza y la melaza son buenos y económicos para desarrollar biopreparado y obtener un probiótico aceptable para la alimentación animal

**Palabras claves:** Biopreparado, Cultivo Mixto, Melazas, Probiótico, Vinazas.

#### Introducción

Los biopreparados probióticos han sido elaborados con uno o varios tipos de microorganismos<sup>6</sup>. Esos biopreparados se utilizan como suplementos dietéticos en la producción animal<sup>3</sup>. Algunos estudios reportan las bondades que presentan los biopreparados, tales como reducción de los enteropatógenos, favorecen cambios en la mucosa intestinal y mejoran el comportamiento productivo con raciones bajas en proteínas<sup>13</sup>. Han sido, además, promotores de crecimiento, estimuladores del sistema inmune y correctores del balance de la población microbiana<sup>5</sup>. El presente trabajo tuvo como objetivo elaborar un biopreparado a partir de un cultivo mixto de bacterias lácticas y levaduras desarrolladas en el sustrato melaza-vinaza.

#### Materiales y Métodos

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio bromatológico y microbiológico de la Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y Laboratorio de microbiología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba.

**Característica de la materia prima:** Vinaza naranja: Materia seca (MS), Ceniza (Cz), Proteína cruda (PC), Proteína verdadera (PV) de 20; 2,5; 19 y 10% v/v respectivamente, pH 3,56. Melaza: MS, PC, PV, Cz: 85; 2,7; 0,8 y 1,1% v/v, pH 5,8 y grados Brix 72%.

<sup>1</sup> Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Cuba. 2 Escuela Superior Politécnica De Chimborazo. Ecuador

Autor de correspondencia: efra\_miranda@outlook.com



**Selección y activación de las cepas:** Las cepas seleccionadas para la obtención del biopreparado fue: *Kluyveromyces fragilis* (L-4 UCLV) proveniente del Banco de Microorganismos de la Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba y cuatro cepas ATCC (American Type Cultures Collection, USA), *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Las cepas, en formato liofilizadas, fueron activadas individualmente en 120 mL de caldo soya trip-tona a 37 °C para el caso de bacterias y 30 °C para las levaduras, en una estufa con zaranda 60 rpm durante 6 h. Seguidamente fueron cultivadas en placa con medio de cultivo Agar MRS y Nutritivo para *L. acidophilo*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, respectivamente. Para las levaduras fueron utilizadas Agar Sabouraud. Los *lactobacillus* fueron cultivados en condiciones anaerobias utilizando jarra GasPak Plus™.

**Obtención de la biomasa:** Las cepas *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*. *S. cerevisiae* y *K. fragilis* L-4 UCLV fueron inoculados con 5 mg cada uno (balanza analítica, Radwag™ AS 220/3Y). La mezcla de estos cultivos fue inoculada en 250 mL de leche descremada a 30 ± 2 °C y se incubó a 37 °C durante 24 h. Se realizó recuento inicial en placa para verificar viabilidad de las cepas.

**Obtención de los Biopreparados:** En un sustrato de 300 g (30%) melaza de caña de azúcar estéril y 875 mL (57,5%) de vinaza de naranja, homogenizado a 150 rpm en un agitador magnético (JOAN o OEM MS001) a 30 °C durante 10 min, se inocularon 125 mL (12,5 %) de biomasa previamente obtenidas. Tras la incubación a 37°C durante 24 h, se tomaron muestras del biopreparado para la caracterización. Dicho procedimiento se repitió por 5 veces.

**Caracterización física y química de los Biopreparados:** Color sistema CIELab\* se midió con un colorímetro (CR-400, Konika Minolta) y también se comparó con código HTML, el sabor y el olor fueron evaluados por los sentidos sensoriales del investigador. La determinación de PC y PV se realizó siguiendo la metodología de normas INEN<sup>7</sup>. MS, Cz y extracto etéreo (EE), mediante la metodología descrita por AOAC<sup>2</sup>.

**Determinación microbiológica:** El recuento celular, viabilidad, y ácido láctico se midieron siguiendo las técnicas

descritas por Sourav y Arijit,<sup>12</sup> Marin,<sup>9</sup> y Rodríguez<sup>10</sup> respectivamente. El biopreparado fue inoculado en 50 mL de suero fisiológico e incubado por 24 h a 37°C. Posteriormente se centrifugaron las muestras (BD DYNAC™ III) a 600 rpm por 5 min. Así mismo se prepararon diferentes concentraciones hasta la escala 0,5 del esquema MacFarland para la viabilidad, utilizando la técnica descrita por Rodríguez<sup>9</sup>.

**Valoración económica:** No se tuvieron en cuenta los gastos de salario, energía, amortización por ser iguales. Los costos de la materia prima fueron recomendados por Ministerio de Agricultura Ganadería Acuicultor y pesca<sup>5,4</sup>.

**Análisis Estadístico:** Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con el empleo del paquete estadístico Statgraphic plus v 15.1 para Windows (Company, City, EEUU). En el caso de los conteos de microorganismos, los datos se transformaron según log<sub>x</sub> para garantizar la normalidad de varianza.

## Resultados y Discusión

No se observaron cambios en las características físicas del biopreparado durante el tiempo de conservación (tabla 1).

Similares resultados fueron presentados en melaza de caña más leche fermentada<sup>10</sup>, suero de leche más melaza<sup>5</sup> y en levadura de torula más melaza<sup>11</sup>. Durante el tiempo de conservación se presentaron cambios (P<0,05) en los parámetros de MS, PC y PV, (ver tabla 2).

Similares resultados fueron reportados por Jurado *et al.*<sup>8</sup> Los resultados obtenidos en el presente estudio son coincidentes con los reportados por otros autores<sup>13,1 y 3</sup>.

Los resultados obtenidos en cuanto a las características microbiológicas se reflejan en la tabla 3. La media de la concentración microbiana se mantuvo en 9x10<sup>9</sup> (UFC/mL) hasta el final del experimento. La viabilidad, la concentración de ácido láctico y el pH se redujeron (P<0,05) a los 90 días con relación con la etapa inicial. Resultados semejantes a los nuestros fueron reportados por otros autores<sup>12, 8</sup>.

Se elaboró 10 L del biopreparado, cantidad suficiente para tratar a mil lechones, al suplementar 1 mL/animal cada tres días en la etapa neonato y crías<sup>10</sup>. Esto pudiera significar el ahorro de aproximadamente de \$ 293,50, por sustitución de antibióticos por probióticos (datos no mostrados en la tabla)

Parámetros	Tiempo de conservación					
	Inicio		45		90	
Color (CIELab* System)	L* 31.85	a* 11.48	L* 31.93	a* 11.42	L* 41.93	a* 13.44
	C* 27.08	b* 24.52	C* 26.41	b* 23.81	C* 26.44	b* 23.80
	H 64.91		H 65.31		H 63.87	
Color código (HTML)	#603E13B		#613E73B		#603513B	
Sabor	Ácido dulzón agradable		Ácido dulzón agradable		Ácido dulzón agradable	
Olor	Ácido dulzón		Ácido dulzón		Ácido dulzón	
Textura	Líquido		Líquido		Líquido	

L\*a\*b\*C\*H valores mediante espectrofotómetro de absorbancia atómica, HTML, comparación de color.

Tabla 1. Características físicas del biopreparado

Parámetros (%)	Tiempo de conservación			
	Inicio	45 días	90 días	EE ±
Materia seca	15.12 <sup>a</sup>	16.12 <sup>b</sup>	18.10 <sup>a</sup>	0.12
Ceniza	4.36 <sup>b</sup>	4.37 <sup>a</sup>	4.36 <sup>b</sup>	0.01
Estrato etéreo	3.22 <sup>b</sup>	3.25 <sup>a</sup>	3.25 <sup>a</sup>	0.25
Proteína cruda	19.23 <sup>b</sup>	19.51 <sup>b</sup>	20.70 <sup>a</sup>	0.34
Proteína verdadera	12.20 <sup>a</sup>	12.60 <sup>b</sup>	12.84 <sup>a</sup>	0.31

\*\*\* Letras desiguales en la misma fila, las medias difieren a  $P < 0.05$  (Duncan 1955).

Tabla 2. Parámetros bromatológicos del biopreparado.

Parámetros	Tiempo de conservación			
	Inicio	45 días	90 días	EE ±
Concentración microbiana (ufc/mL)	$9 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	-
Viabilidad (%)	95 <sup>a</sup>	94 <sup>b</sup>	93 <sup>a</sup>	0.01
Ácido láctico (mmol/mL)	0.65 <sup>a</sup>	0.64 <sup>a</sup>	0.64 <sup>b</sup>	0.12
pH	4.41 <sup>a</sup>	3.85 <sup>b</sup>	3.85 <sup>b</sup>	0.03

\*\*\* Letras desiguales en la misma fila, las medias difieren a  $P < 0.05$  (Duncan 1955).

Tabla 3. Característica microbiológica del biopreparado.

## Conclusiones

Es factible producir un biopreparado con efecto probiótico a partir de cultivos mixtos de bacterias y levaduras desarrollados en melaza de caña de azúcar y vinaza de naranja, conservados durante 90 días.

## Referencias bibliográficas

- Ana S Mendoza Gardeazábal, (2013). Caracterización de la levadura *Kluyveromyces marxianus* como microorganismo probiótico. Tesis en opción al grado científico Maestría. Universidad Autónoma Del Estado De Hidalgo. Estado De Hidalgo. Mexico. URL: <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/biblioteca/digital/handle/231104/1862>
- AOAC. (2014). Official Method of Analysis 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gathersburg, MD.
- Ayala L., García-Hernández Y., Savón L.L., Boucourt R., Castro M., Herrera M. (2014). Actividad probiótica de *Lactobacillus pentosus* en cerditos destetados. Revista Computadorizada de Producción Porcina. 21 (3). 130-133. URL: [http://www.iip.co.cu/RCP/213/213\\_artLAyala.pdf](http://www.iip.co.cu/RCP/213/213_artLAyala.pdf)
- Catálogo de Bayer (2015): <http://vademecumsani.com/index.php>
- Duncan, D.B. (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11:1. URL: <http://dx.doi.org/10.2307/3001478>
- Flores L., Elías A., Proaño F., Granizo G., Medina Y., López S., Herrera F. (2015). Effects of a microbial preparation, a probiotic and commercial antibiotic on the productive performance and pigs health in post-weaning period. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 49, 3: 357-369. URL: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193042629011>
- Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365-378. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x/abstract>
- INEN 0016 (1984). Control Microbiológico de los Alimentos. Quito. Ecuador. URL: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0016.1984.pdf>
- Jurado H., Ramírez C., Martínez J. (2013). Evaluación in vivo de *Lactobacillus plantarum* como alternativa al uso de antibióticos en lechones. *Rev. MVZ Córdoba*, 18, 3648-3657. URL: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69329148008>
- María Rodríguez González (2009). Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Tesis en opción al grado científico de doctor en ciencias. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España. URL: <http://es.slideshare.net/valdivia1314/tesisaislamiento-de-cepas-de-lactobacillus-con-capacidad-probiotica>
- Marín Cárdenas A. (2008). Desarrollo de la tecnología de producción del BIOPRANAL. Tesis en opción al grado científico de doctor en ciencias. Universidad Central de Las Villas, Villa Clara, Cuba.
- Pavan R., Jain S., Kumar A. (2012). Properties and therapeutic application of bromelain: a review. *Biotechnol. Res. Int.* 2012, 6. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/976203>
- Roque N. (2015). Uso de un aditivo probiótico en la alimentación cunícola. Tesis en opción al grado científico de Master en ciencias. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara, Cuba.
- Sourav B, Arijit D. (2010). Study of physical and culture parameters on the bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional indian fermented food. *American Journal of Food Technology* 5 (2): 111-120. URL: <http://www.scialert.net/qredirect.php?doi=ajft.2010.111.120&linkid=pdf>
- Zhao R., Sun J., Torley P., Wang D., Niu S. (2008). Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: pp. 1349-1354. DOI:10.1007/s11274-007-9615-0

Recibido: diciembre 2016

Aprobado: febrero 2017

## INVESTIGACIÓN

## Identidad de la vacuna contra *Streptococcus pneumoniae* "Quimi-Vio" mediante la técnica Dot Blot empleando los anticuerpos monoclonales contra los polisacáridos capsulares 1,5, 6B, 14 y 19F de la bacteria.

Identity of the "Quimi-Vio" *Streptococcus pneumoniae* vaccine using the Dot Blot technique using monoclonal antibodies against the capsular polysaccharides 1,5, 6B, 14 and 19F of the bacterium.

Elizabeth González Aznar<sup>1</sup>, Rubén Adonis Cabrera Arias<sup>1</sup>, Fidel Ramírez Bencomo<sup>1</sup>, Abel Roscoe Fajardo Sánchez<sup>1</sup> y Reinaldo Acevedo Groguez<sup>1</sup>

DOI. 10.21931/RB/2017.02.01.7

## RESUMEN

*Streptococcus pneumoniae* (neumococo) constituye una de las principales causas de enfermedades infecciosas bacterianas, particularmente en niños menores de 2 años de edad. Basadas en el polisacárido capsular (PsC), su principal factor de virulencia, existen dos tipos de vacunas aprobadas para uso en humanos: las vacunas polisacáridas planas y las vacunas polisacáridas conjugadas. Quimi-Vio, la vacuna antineumocócica cubana, pertenece al segundo grupo y está compuesta por los PsC de los siete serotipos de mayor incidencia y circulación en Cuba (1, 5, 6B, 14, 18C, 19F y 23F). El objetivo de este trabajo fue realizar el ensayo de identidad de la vacuna cubana Quimi-Vio empleando los AcM contra los PsC 1, 5, 6B, 14, y 19F de Sp obtenidos recientemente en el Instituto Finlay de Vacunas, teniendo en cuenta que los Ensayos de identidad de las vacunas son requisito indispensable para la liberación final de los lotes. La técnica empleada para la realización del ensayo de identidad de Quimi-Vio fue el *Dot Blot*, donde empleando membrana de Nitrocelulosa se realizó la captura de tres lotes de vacuna Quimi-Vio y como control positivo de la técnica los respectivos PsC de los serotipos 1, 5, 6B, 14, y 19F sin conjugar y una vacuna comercial Prevenar-13. Para la identidad de los PsC de neumococo se emplearon los respectivos AcM a una concentración de 10µg/mL y como segundo anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa teniendo en cuenta que los AcMs empleados son murinos. Cada AcM fue capaz de identificar de forma altamente específica al PsC homólogo (mismo serotipo), tanto en su forma no conjugada y monovalente como en el contexto de las vacunas Quimi-Vio y Prevenar 13V, donde además de estar conjugado al TT se encuentra mezclado con otros PsC de forma multivalente. La técnica *Dot Blot* empleando los AcMs contra los PsC serotipos 1, 5,6B, 14 y 19F permite identificar de forma específica cada PsC en la formulación multivalente, por lo que puede ser utilizada para el ensayo de identidad de la vacuna Quimi-Vio, garantizando así la liberación de lotes y control de la calidad de la misma.

**Palabras claves:** Ensayo de Identidad, *Dot Blot*, Vacunas antineumocócicas, Anticuerpos Monoclonales.

## ABSTRACT

*Streptococcus pneumoniae* (*Sp*) is one of the major causes of bacterial infectious diseases, particularly in children under 2 years of age. There are two types of vaccines approved for human use: polysaccharide vaccines and polysaccharide conjugate vaccines. Quimi-Vio, the Cuban pneumococcal vaccine belongs to the second group and is composed by the PsC of the seven serotypes with the highest incidence and circulation in Cuba (1, 5, 6B, 14, 18C, 19F and 23F). The objective of this work was to carry out the identity test of the Quimi-Vio vaccine using the monoclonal antibodies (MAbs) against PsC 1, 5, 6B, 14, and 19F of Sp obtained recently at the Finlay Institute of Vaccines. The technique proposed for the identity test was *Dot Blot*. The first step consisted in selecting the optimum capture and detection concentrations of PsC and MAb respectively. For the identity test three batches of Quimi-Vio vaccine were evaluated and as positive controls of the technique PsC of the five serotypes and the commercial vaccine Prevenar-13 were used. 100 µL/well was applied, equivalent to 0.4 µg of PsC/well and the MAbs were used at 2.5 µg / mL concentrations selected as optimal. For all concentrations of PsC evaluated for capture there was recognition (signal) with all concentrations of MAb used, even with the minimum concentration of PsC and MAb employed (120 ng/mL and 2.5 µg/mL). In the identity test each MAb was able to identify specifically the homologous PsC (same serotype), in its non-conjugated and monovalent form, and in the context of the Quimi-Vio and Prevenar 13V vaccine, where PsC are conjugated to tetanus toxoid and mixed with other PsC in multivalent form. The *Dot Blot* technique, using the MAbs against the PsC serotypes 1, 5,6B, 14 and 19F can be used for the identity test of Quimi-Vio vaccine, assuring that in a specific way, the PsC conjugates present in the multivalent formulation were identified.

**Key words:** Identity Assay, Monoclonal Antibodies, Antineumococcal Vaccines, *Dot Blot*

<sup>1</sup>Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales del Departamento de Evaluación Biológica, Área de Investigaciones, Instituto Finlay de Vacunas. A.P. 16017, La Habana Cod. 11600, Cuba.

Autor de correspondencia:elygonzalez@finlay.edu.cu



## Introducción

*Streptococcus pneumoniae* (*Sp*), es una bacteria Gram Positiva, cuyo hábitat natural es la nasofaringe humana, encontrándose que entre el 5-10% de los adultos y el 20-40% de los niños son portadores asintomáticos. Esta bacteria se trasmite de persona a persona a través de gotas de saliva y el contagio aumenta en espacios cerrados, lo que hace que los círculos infantiles y hogares de ancianos sean lugares de alta diseminación de la bacteria<sup>1</sup>.

La infección por *Sp* puede presentarse con muchas manifestaciones clínicas incluyendo meningitis, septicemia, bacteriemia, neumonía, otitis media aguda y sinusitis. Sin embargo, se reconoce sobre todo como el principal agente etiológico de Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC). La NAC afecta principalmente a niños (lactantes y hasta 2 años) y ancianos. La infección neumocócica causa cada año aproximadamente 14.5 millones de casos de enfermedad neumocócica invasiva (ENI) y 0.7-1 millones de muertes en niños menores de cinco años de edad, sobre todo en países en desarrollo y subdesarrollados<sup>2</sup>.

Al menos 93 diferentes serotipos de *Sp* han sido identificados basados el polisacárido capsular (PsC), su principal factor de virulencia y contra los cuales ha ido dirigido el desarrollo de vacunas. Existen dos tipos de vacunas antineumocócicas licenciadas y aprobadas para su uso en humanos, todas empleando el PsC como principal antígeno. Por un lado tenemos las vacunas polisacáridicas planas (VPP) y por otro las vacunas polisacáridicas conjugadas (VPC), y el empleo de uno u otra dependen sobre todo de la edad de la persona a inmunizar. (Tabla 1)<sup>3,4</sup>. Otro número considerable de vacunas contra el *Sp* se encuentran en investigación-desarrollo o en fase uno-dos de ensayo clínico, como es el caso de la vacuna antineumocócica cubana Quimi-Vio.

Quimi-Vio es una vacuna polisacáridica heptavalente conjugada desarrollada en el Instituto Finlay de Vacunas y compuesta por los PsC de los siete serotipos de mayor incidencia y circulación en Cuba (1, 5, 6B, 14, 18C, 19F y 23F), todos conjugados al Toxoide Tetánico (TT) como proteína portadora y adsorbidas en Fosfato de Aluminio (AlPO4)<sup>5,6</sup>.

Las vacunas profilácticas como Quimi-Vio, a diferencia de otros medicamentos, son administradas generalmente a personas sanas, principalmente niños, en su primer año de vida. Es por eso que desde 1981, la Organización Mundial de la Salud estableció regulaciones que garanticen la efectividad, eficacia y seguridad de las vacunas, desde las etapas de investigación-desarrollo hasta la liberación final del producto<sup>7,8,9</sup>. Estos controles incluyen (dentro de muchos otros), la identificación de los ingredientes activos presentes en las vacunas, como un requisito obligatorio para la liberación final del producto<sup>8,9</sup>.

Varias son las técnicas empleadas para llevar a cabo los ensayos de identidad de vacunas, sin embargo, las técnicas inmunoenzimáticas como los ELISAs, *Dot* y *Western Blot*, han sido las más empleadas por ser técnicas sencillas, rápidas y de fácil realización e interpretación de los resultados<sup>7,8,9</sup>. En el caso del ensayo de identidad de Quimi-Vio se necesitaría además técnicas altamente específicas que permitan identificar cada PsC (de los siete presentes) en la formulación multivalente.

En este sentido, los anticuerpos monoclonales (AcM) con sus propiedades excepcionales de alta sensibilidad y especificidad, se han convertido en una potente herramienta analítica, que ha permitido, en otras vacunas polisacáridicas multivalentes contra *Nesisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*, realizar la identidad y cuantificación de los PsC de forma altamente específica en la formulación vacunal<sup>10,11</sup>.

Recientemente el Laboratorio de AcM del Instituto Finlay de Vacunas, obtuvo AcM contra cinco de los siete PsC de *Sp* presentes en Quimi-Vio (1, 5, 6B, 14, y 19F). La alta especificidad y elevada constante de afinidad de estos AcM obtenidos, sugiere su posible uso como herramienta analítica para la identidad de la vacuna Quimi-Vio.

El presente trabajo propone la realización del ensayo de identidad de la vacuna cubana Quimi-Vio por *Dot Blot* empleando los AcM contra los PsC 1, 5, 6B, 14, y 19F de *Sp* obtenidos en el Instituto Finlay de Vacunas.

Tipo de Vacuna	Edad de aplicación	Composición	PsC incluidas
Vacunas Polisacáridicas Conjugadas	Para niños menores de 2 años e infantiles de 2 a 6 años de edad	Neumovac (7-valencia, Pfizer)	4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, y 23F conjugados a CRM197 la variante atenuada de la Toxina Esférica (TE)
		Prevnar II (13-valencia, Pfizer)	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F conjugados a CRM197
		Synflorix (10-valencia, GlaxoSmithKline)	1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F conjugados a la proteína D (de <i>Haemophilus influenzae</i> ) excepto 18C y 19F conjugados a TT y TE respectivamente
Vacunas Polisacáridicas	Adultos en riesgo de enfermedad (≥ 65 años)	Pneumovac (23-valencia, Merck)	1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15, 18, 17F, 19C, 19A, 19F, 20, 23F, 23F y 34F

Tabla 1. Vacunas antineumococicas licenciadas

## MATERIALES y METODOS

### Muestras:

Polisacáridos Capsulares (PsC) de *Sp* serotipos 1, 5, 6B, 14, y 19F. Lotes 15.01 obtenidos en la planta de desarrollo del Instituto Finlay de Vacunas, preparados todos a una concentración de 16 µg / mL en agua destilada. Anticuerpos Monoclonales (AcM) contra los PsC de *Sp* serotipos 1, 5, 6B, 14, y 19F, obtenidos en el Laboratorio de AcM del Instituto Finlay de Vacunas

Quimi-Vio: Vacuna polisacáridica conjugada heptavalente contra *Sp* serotipos 1, 5, 6B, 14, 18C, 19F y 23 F, lotes NEU.15.01, NEU.15.02 y NEU.16.02. Obtenida en condiciones GMP en la planta de producción del Instituto Finlay de Vacunas. Composición: 4.4 µg/mL de todos los PsC excepto 6B que se encuentra al doble.

Prevenar® 13V: Vacuna conjugada neumocócica 13 valente, de Pfizer, lote 926785.02. Composición: 4.4 µg/mL de todos los PsC excepto 6B que se encuentra al doble.

Para la realización del *Dot Blot*, se utilizó un equipo Minifold II S&S (Alemania) acoplado a bomba de vacío y se empleó membrana de nitrocelulosa (MNC) de 0,2 µm (Bio-Rad, EUA). Se realizaron dos *Dot Blot* con los siguientes objetivos: 1) seleccionar las concentraciones óptimas de PsC y AcM a emplear para la captura y la detección respectivamente; 2) realizar el ensayo de identidad de la vacuna heptavalente cubana Quimi-Vio.

### Selección las concentraciones óptimas de PsC y AcM a emplear para la captura y la detección respectivamente:

Para la captura, se aplicaron en forma de curva desde 16 µg/mL hasta 0.125 µg/mL los diferentes PsC (1, 5, 6B, 14 y 19F) de *Sp*, con un volumen de aplicación de 100 µL/pozo. Cada curva de PsC se aplicó por triplicado, para ser enfrentadas a las diferentes concentraciones del AcM evaluadas. Luego de 1 minuto de vacío para garantizar el secado de la MNC, se extrajo del equipo y se procedió al proceso de bloqueo de los sitios activos remanentes con PBS-Leche Descremada (LD) al 0.5% e incubación de 30 min a 37°C. Pasado este tiempo y tras tres lavados de 5 min con PBS/Tween-20 al 0.05%, se recortó la MNC en tiras verticales (3 tiras por cada PsC) y cada tira fue incubada 1h a 37°C con 10 mL del AcM homólogo a diferentes concentraciones 2.5, 5 y 10 µg/mL en PBS. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 min y se incubaron todas las tiras durante 1h a temperatura ambiente con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Amersham) a una dilución 1:4000. Transcurrida la hora y tras 3 lavados de 15 min cada uno, el revelado de la reacción se realizó empleando Tableta SIGMAFAST™ DAB durante 10 min. La reacción se detuvo realizando varios cambios de agua destilada. Se seleccionó como concentración óptima de captura de cada PsC y de detección de cada AcM, la menor concentración donde se visualizó señal.

### Identidad de la vacuna heptavalente cubana Quimi-Vio:

El procedimiento empleado fue muy similar al descrito anteriormente, en este caso se emplearon un total de cinco tiras de MNC y en cada una se aplicaron 100 µL (equivalente a 0.44 µg/pozo) de las siguientes muestras: PsC de *Sp* serotipo 1, 5, 6B, 14, y 19F, tres lotes de Vacuna Quimi-Vio y un lote de Vacuna Prevenar 13V. Posterior al bloqueo de los sitios remanentes de la MNC y tras pasos de lavado, en igual condiciones al ya descrito, cada tira fue incubada durante 1 h a 37°C, con 10 mL de AcM anti PsC serotipos 1, 5, 6B, 14, y 19F, (uno por tira), preparados a una concentración de 2.5 µg/mL en PBS. El resto de los procedimientos fueron realizados de forma similar a la ya descrita. Estos ensayos de identidad fueron realizados por triplicado para confirmar los resultados obtenidos.

### Captura y procesamiento de las imágenes:

Las imágenes de los *Dot Blot* fueron capturadas y procesadas utilizando un densitómetro GS-800 (Bio-Rad, EUA) con software de cuantificación (Quantity One).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Existen dos medidas en Salud Pública que han tenido un extraordinario impacto en la salud de los ciudadanos del mundo a lo largo de los años: la potabilización del agua y la vacunación. Las vacunas constituyen una de las medidas sanitarias que mayor beneficio ha producido y sigue produciendo a la humanidad, previendo enfermedades que antes causaban grandes epidemias, muertes y secuelas. Por otro lado, las vacunas benefician no solo a las personas vacunadas sino también a las personas no vacunadas y susceptibles que viven en su entorno (inmunidad de grupo)<sup>12,13</sup>.

Sin embargo, el desarrollo de una vacuna es un largo, complejo y costoso proceso donde alrededor del 70% del tiempo es dedicado a la caracterización y al control de la calidad (CC) de este producto. La caracterización y el CC de las vacunas es más difícil que la de otros productos farmacéuticos, debido a la compleja estructura molecular de los antígenos que contienen, sus procesos de producción, y su interacción con agentes utilizados durante la fabricación o presentes en el lote final, tales como conservantes y adyuvantes<sup>14,15</sup>.

En el pasado, el CC de las vacunas dependía principalmente de métodos para asegurar que los productos fueran seguros y potentes. Hoy en día se exigen otros requisitos adicionales como identidad, estabilidad, pureza, estructura del antígeno y consistencia en la producción, para obtener la aprobación regulatoria<sup>16</sup>.

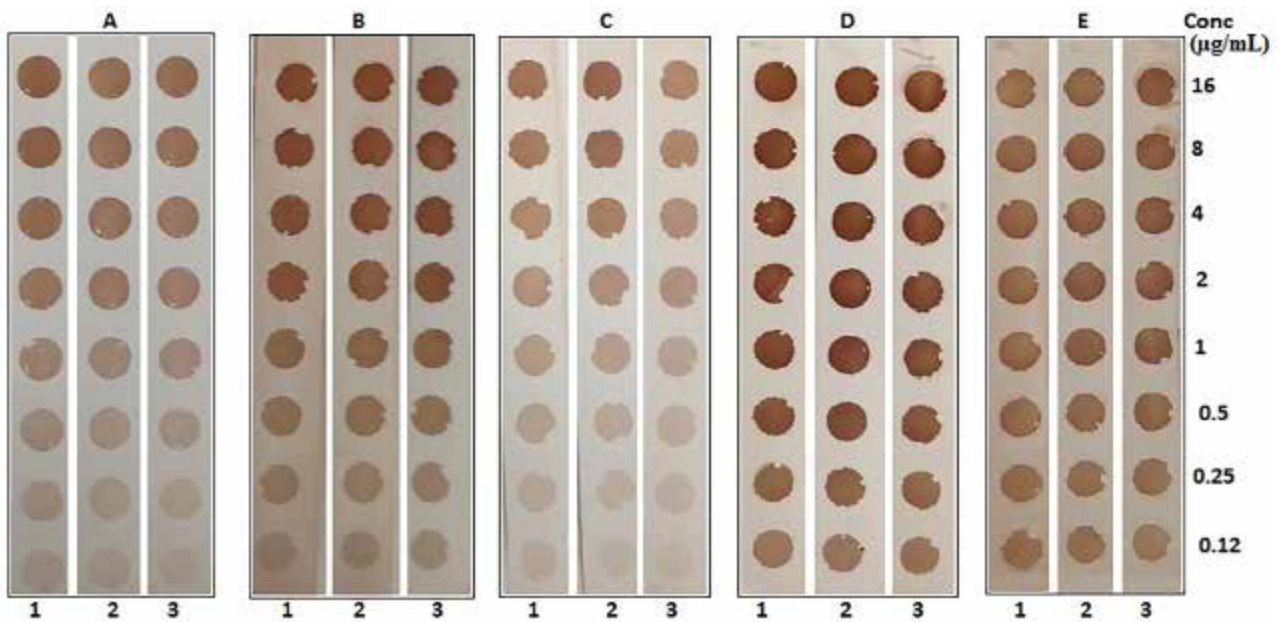
Así el Ensayo de Identidad (EI) se establece por la Organización Mundial de la salud (OMS) y las autoridades Regulatorias Nacionales (en Cuba el CECMED) como un requisito obligatorio para toda liberación final de una vacuna. Entiéndase como EI un conjunto de métodos destinados a identificar en una formulación, el o los principios activos presentes y declarados en las especificaciones del producto. El EI se le realiza no solo a la vacuna final, sino también a los productos de partidas (materias primas) o a los Ingredientes farmacéuticos Activos (IFAs), que participan en el proceso de desarrollo de una vacuna. Deben ser en lo posible rápidos, sencillos, sensibles y sobre todo, específicos. Generalmente son métodos cualitativos más que cuantitativos<sup>16,17</sup>.

En el caso de la vacuna cubana contra el *Sp*, Quimi-Vio, el EI tiene como objetivo identificar (cualitativamente) en el contexto de la formulación multivalente final, con una alta especificidad los siete PsC presentes en la misma. En este trabajo se presenta el *Dot Blot* como método para llevar a cabo el EI de esta vacuna, empleando los AcM contra cinco de los siete PsC presentes en la vacuna (1, 5, 6B, 14, y 19F), por ser los que hemos podido obtener en nuestro laboratorio.

### Selección las concentraciones óptimas de PsC y AcM a emplear en el *Dot Blot* para la captura y la detección respectivamente:

En los ensayos inmunoenzimáticos como el *Dot Blot*, donde hay una etapa de inmovilización o captura de una biomolécula, determinar la concentración óptima de la misma a inmovilizar (en este caso el PsC) es un factor de suma importancia. Igualmente lo es la selección de las concentraciones óptimas de la molécula reactante (el AcM en este caso). Estos parámetros influyen en la formación de los complejos Ag-Ac, donde las concentraciones de ambas moléculas tienen que estar en el rango de la zona de equivalencia<sup>18</sup>.

Por esto como primer paso antes de realizar el Ensayo de Identidad de la vacuna, se realizó un análisis de las concentraciones de los PsC y de los AcM a emplear para que exista reconocimiento (señal). Figura 1.

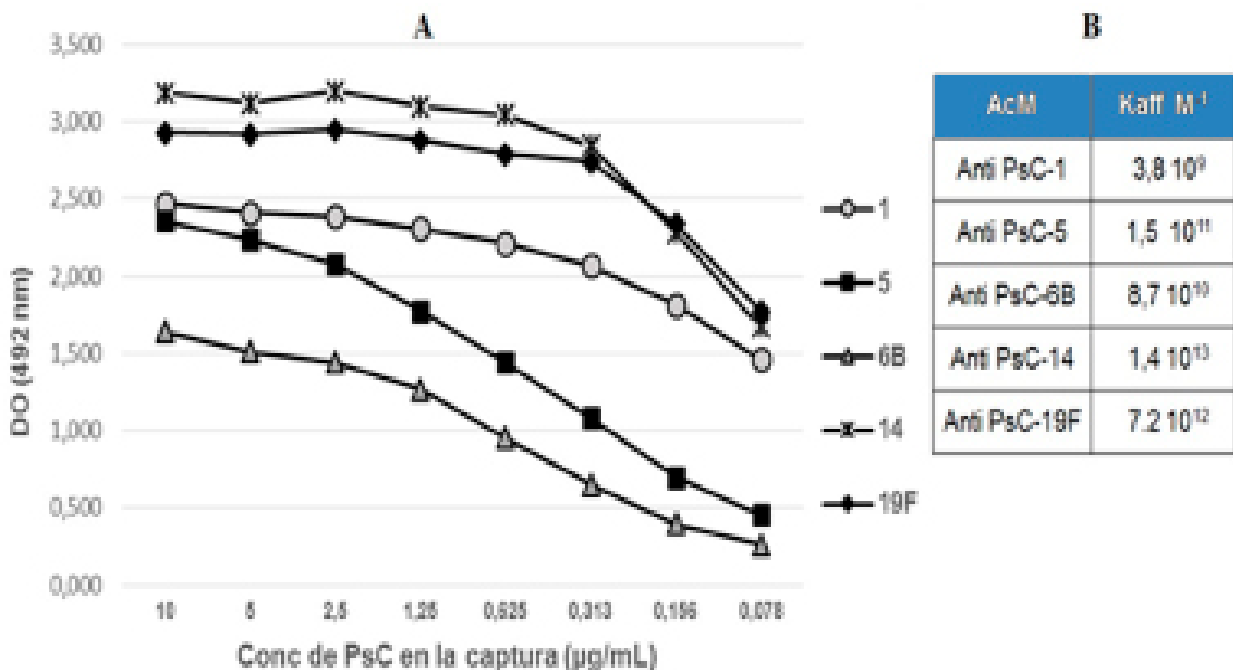


**Figura 1.** Determinación de la concentración óptima de los PsC y de los AcM para el Dot Blot. Los PsC de Sp (A:PsC-1, B:PsC-5, C:PsC-6B, D:PsC-14 y E:PsC-19F) se aplicaron en forma de curva desde 16 µg/mL hasta 0.125 µg/mL, por triplicado para cada una ser enfrentadas a diferentes concentraciones del AcM homologo (1:2.5 µg/mL, 2:5 µg/mL y 3:10 µg/mL). Las imágenes fueron capturadas y procesadas utilizando un densitómetro GS-800 (Bio-Rad, EUA) con software de cuantificación (Quantity One).

En la Figura 1 se puede observar la presencia de manchas oscuras o señal (reconocimiento del PsC por su respectivo AcM) para todas las concentraciones de captura de los PsC evaluados y para todas las concentraciones de detección de los AcM empleados, llegando a observarse señal hasta la concentración mínima de PsC aplicada (120 ng/mL) para todas las concentraciones de AcM empleada. Para los PsC del serotipo 1(A), 5(B) y 6B (C) de Sp, existe una relación dosis-respuesta, pues a medida que disminuye la concentración de PsC inmovilizado, disminuye también la intensidad de la señal. Sin embargo, para los PsC de los serotipos 14 (D) y 19 F (E), este comportamiento no se observa. En la Fig 1 también se puede observar que en ninguno de los casos se observa una variación de la señal con el incremento en la

concentración del reactante (AcM). Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en el laboratorio durante el proceso de caracterización de los AcM y están relacionados con la alta sensibilidad y afinidad de estos AcM, siendo los AcM de mayor sensibilidad y afinidad los de 14 y 19F, lo que explica en el *Dot Blot* por qué no se ve una caída en la señal al disminuir la concentración de PsC ni de AcM, porque estamos en presencia de la zona de saturación o meseta de la reacción como se observa también en el ELISA. (Figura 2)

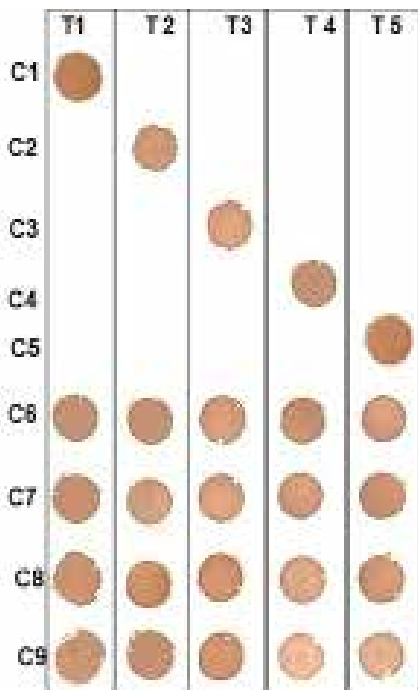
Este paso es llamado por muchos autores como estandarización del método y es muy importante. Primero porque las elevadas concentraciones del material de captura pueden provocar alteraciones en la sensibilidad y en el límite de detección del ensayo (efecto



**Figura 2.** Sensibilidad y Afinidad de los AcM anti PsC serotipos 1,5, 6B, 14 y 19F de Sp. A) ELISA indirecto donde se recubre con concentraciones decrecientes de los diferentes PsC y los AcM se emplearon a una concentración de 10 µg/mL. B) Kaff: Constante de afinidad de los AcM.



“gancho”) por la formación de sobrecapas de biomoléculas débilmente adsorbidas, que se liberan fácilmente en los pasos siguientes, inhibiendo los inmunorreactantes en la fase líquida<sup>9</sup>. Por otro lado si tenemos en cuenta que la vacuna Quimi-Vio tiene una concentración por PsC de 4.4 µg/mL, significa que al aplicar 100 µL/pozo (volumen de trabajo sugerido) para la captura estaríamos aplicando 0.44 µg/poro, cantidad en la que es necesario conocer de ante mano si existe reconocimiento, sobre todo porque es una concentración inferior a lo que se reporta como suficiente para que exista reconocimiento (1-10 µg/mL)<sup>9</sup>. Como se puede observar en la Fig 1 si existe reconocimiento a esta concentración e incluso a menos, lo que permitiría poder hacer diluciones de hasta 1:2 y 1:3 de la vacuna para el EI, permitiendo así el ahorro de muestra en el ensayo.



**Figura 3.** Identidad de la Vacuna Quimi-Vio mediante la técnica Dot Blot. Se emplearon cinco tiras (T) de MNC 0.2 µm y en cada una se aplicaron 100 µL de las siguientes muestras: Carril (C) del 1 al 5, PsC de *Streptococcus pneumoniae* serotipos 1, 5, 6B, 14, y 19F en ese mismo orden, C6, 7 y 8: Vacuna Quimi-Vio lotes NEU.13.02, NEU.15.01 y NEU.15.02 respectivamente y en C8 Vacuna Prevenar 13V. Cada tira fue enfrentada a uno de los cinco AcMs anti PsC serotipos 1(T1), 5 (T2), 6B (T3), 14 (T4) y 19F (T5). Como segundo anticuerpo se empleó Anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa, dilución 1: 3000. Las imágenes fueron capturadas empleando un densitómetro GS-800 (Bio-Rad, USA).

### Identidad de la vacuna heptavalente cubana Quimi-Vio:

Varios han sido los métodos empleados para llevar a cabo la Identidad de las vacunas: Resonancia magnética Nuclear, Cromatografía en Fase Reversa, 2D Electroforesis (Foco Isoeléctrico más SDS-PAGE), Espectrometría de Masa, Western y *Dot Blot* Automatizado capilarmente y Técnicas Inmunoenzimáticas<sup>9,18,19</sup>. Si bien las primeras han revolucionado los EI desde el punto de vista tecnológico en comparación a las técnicas Inmunoenzimáticas como los ELISAs y los *Dot Blot*, tienen las desventajas de ser muy costosas, no al alcance de todos, necesitan de un personal altamente calificado para llevarse a cabo y en la mayoría de los casos lleva un tratamiento previo de la muestra. El *Dot Blot* sin embargo es una técnica muy sencilla, de factible realización y poco consumo de tiempo, así como de fácil interpretación de

los resultados<sup>9,18</sup>. Si a esto le sumamos el empleo en el *Dot Blot* de AcMs de alta especificidad y afinidad, pues hacen de esta técnica una gran herramienta analítica.

Una vez conocida las concentraciones de captura y detección de los PsC y de los AcM respectivamente, se desarrolló el ensayo de identidad de la vacuna Quimi-Vio. (Figura 3)

Como se puede apreciar en la Figura 3, cada AcM es capaz de identificar de forma altamente específica al PsC homólogo (mismo serotipo), tanto en su forma no conjugada y monovalente (carriles del 1 al 5) como en el contexto de las vacunas Quimi-Vio y Prevenar 13V, donde además de estar conjugado al TT se encuentra mezclado con otros PsC de forma multivalente y adsorbidos en fosfato de Aluminio. Dicho reconocimiento se evidencia por la presencia de manchas oscuras (señal) solamente en el pozo donde se encuentra inmovilizado el PsC homólogo. Sin embargo en el resto de los pozos donde se encuentran los otros PsC no se observa señal, no evidenciándose reactividad cruzada. Por ejemplo, la tira 1 (T1) fue enfrentada al AcM anti PsC serotipo 1 de Sp y solamente se observa señal en los carriles donde se aplicó el PsC 1 y los tres lotes de QuimiVio y Prevenar 13V, no observándose señal en los carriles donde se aplicó los otros PsC (5, 6B, 14 y 19F).

Estos resultados no solo demuestran la alta especificidad y no reactividad cruzada de los AcM empleados, sino también que la técnica *Dot Blot* puede ser empleada para el EI de la vacuna Quimi-Vio.

En el año 2010, los AcM cumplieron 30 años desde su invención, por lo que si bien su obtención no constituye una novedad por estos días, en nuestro caso, el ser propietarios de los hibridomas productores de todos estos AcM, únicos en nuestro país, representa una ventaja indudable, sobre todo si tenemos en cuenta que mediante su aplicabilidad se estaría garantizando el EI de una vacuna como Quimi-Vio que aún se encuentra en ensayo clínico, pero que ya desde estas etapas se está asegurando un requisito indispensable para la liberación final de los lotes, garantizando a su vez parte de su seguridad. Por otro lado, su uso no estaría condicionado a la compra en el mercado de reactivos que así lo garantice por lo que podría resultar más económica la implementación de su uso para esta prueba en la liberación de los lotes de vacunas.

### Conclusiones

Los ensayos de identidad de las vacunas constituyen un aspecto importante para la liberación de lotes y control de la calidad de las mismas. Garantizar los reactivos necesarios para su realización tanto en cantidad como en calidad también es un aspecto necesario. Contar con una batería de AcM (única en el país) con una alta especificidad, reproducibilidad y de producción institucional, es un gran logro. Estos AcM además pueden ser usados con otros fines que no sean solo el de ensayos de identidad.

### Referencias bibliográficas

1. Skinner JM, Indrawati L, Cannon J y col. Pre-clinical evaluation of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15-CRM197) in an infant-rhesus monkey immunogenicity model. *Vaccine*. 2011. Nov 8;29(48):8870-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.09.078.
2. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JPy col. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009. Sep 12;374(9693):893-902. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61204-6.

3. Fedson DS, Nicolas-Spony L, Klemets P y col. Pneumococcal polysaccharide vaccination for adults: new perspectives for Europe. *Expert Rev Vaccines*. 2011. Aug;10(8):1143-67. doi: 10.1586/erv.11.99.
4. Simell B, Auranen K, Käyhty H y col. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev Vaccines*. 2012. Jul;11(7):841-55. doi: 10.1586/erv.12.53
5. Toraño GT, Llanes R, Pías LM, y col. Serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en Cuba y progresión de la resistencia a la penicilina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2010;62(2):157-60. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602010000200012](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602010000200012)
6. Toraño GT, Pías LM, Abreu M, y col. Serotipos y resistencia antimicrobiana de aislamientos meníngeos de *Streptococcus pneumoniae*. Cuba, 2007-2012. *VacMonitor* 2014;23(3):117-123. [www.finlay.sld.cu/vacmonitor.html](http://www.finlay.sld.cu/vacmonitor.html)
7. WHO. WHO vaccine position papers: World Health Organization. Available from: [http://www.who.int/immunization/policy/position\\_papers/en/](http://www.who.int/immunization/policy/position_papers/en/).
8. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Recommendations to Assure the Quality, Safety, and Efficacy of Pneumococcal Conjugate Vaccines. WHO Technical Report Series, No. 977, 2013, Annex 3. [http://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS\\_977\\_Annex\\_3.pdf](http://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_977_Annex_3.pdf)
9. Metz B, van den Dobbelen G, van Els C y col. Quality-control issues and approaches in vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 2009. Feb;8(2):227-38. doi: 10.1586/14760584.8.2.227
10. Reyes F, Amin N, Otero O, y col. Four monoclonal antibodies against capsular polysaccharides of *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, Y and W135: its application in identity tests. *Biologicals*. 2013. July;41(4):275-278. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.05.002>
11. Reyes F, Otero O, Cuello M, y col. Development of four sandwich ELISAs for quantitation of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, W and Y in multivalent vaccines. *J Immunol Methods*. 2014. May;407:58-62. doi: 10.1016/j.jim.2014.03.020. Epub 2014 Apr 12.
12. Greenwood B. The contribution of vaccination to global health: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014. May 12;369(1645):20130433. doi: 10.1098/rstb.2013.0433.
13. Bustreo F, Okwo-Bele JM, Kamara L. World Health Organization perspectives on the contribution of the Global Alliance for Vaccines and Immunization on reducing child mortality. *Arch Dis Child*. 2015. 100(Suppl 1):s34-s37. doi:10.1136/archdischild-2013-305693
14. WHO. Weekly epidemiological record. Pneumococcal vaccines WHO position paper. 2012. No. 14:87.129-144. <http://www.who.int/wer>
15. US.PHARMACOPEIA. USP Guideline for Submitting Requests for Revision to USP-NF. Vaccines. 2007. April V3.1. [http://www.usp.org/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/USPNF/chapter4.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/chapter4.pdf)
16. WHO. Vaccine and immunization quality and safety. Web page [http://www.who.int/immunization/quality\\_safety/en/](http://www.who.int/immunization/quality_safety/en/)
17. Hendriksen C, Arciniega JL, Bruckner L, y col. The consistency approach for the quality control of vaccines. *Biologicals*. 2008;36:73-77. doi:10.1016/j.biologicals.2007.05.002
18. Ochoa RF. Técnicas inmunoenzimáticas en el desarrollo clínico de vacunas. La Habana: Finlay Ediciones; 2013
19. Hamm M, Ha Sha and Rustand R. Automated capillary Western Dot Blot method for the identity of a 15-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Anal. Biochem*. 2015. June;478:33-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2015.03.021>
20. Abeygunawardana C, Williams TC, Sumner JS, y col. Development and validation of an NMR-based identity assay for bacterial polysaccharide. *Anal Biochem*. 2000. Mar 15;279(2):226-40. doi: 10.1006/abio.1999.4470

Recibido: diciembre 2016

Aprobado: febrero 2017

# OMICS 2017

VARADERO, CUBA Oct 28 - Oct 31



The CIGB's Direction of Biomedical Research invites you to attend the VII International Meeting on **Bioinformatics and OMICS: "OMICS 2017"**

The Meeting will cover topics such as Bioinformatics and statistical methods for genomic and proteomic research, Technologies for OMICS data generation

During the meeting, also will be held the workshop: **"OMICS & Structural Biology of viral infections: tightening the control of re-emerging infectious diseases"**, with special emphasis in Dengue, Zika and Chikungunya viruses

## Registration Fee and Information:

### Regular Registration Fee

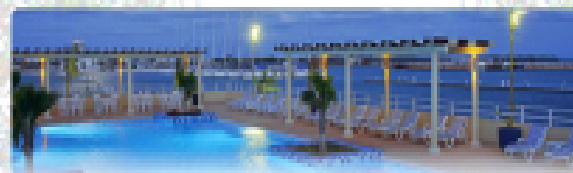
Category	Registration Fee
Student (*)	\$ 350 CUC
Academic	\$ 450 CUC
Business	\$ 500 CUC
Accompanying Person (**)	\$ 100 CUC

### Early Registration Fee

(deadline August 18th, 2017)

Category	Registration Fee
Student (*)	\$ 300 CUC
Academic	\$ 350 CUC
Business	\$ 400 CUC
Accompanying Person (**)	\$ 100 CUC

**Meeting Venue** Melia Marina Varadero Hotel



Download the Melia Marina Varadero hotel Datasheet from:

<http://biomed.cigb.edu.cu/assets/Hotels/Fact%20Sheet%20MV.pdf>

To book your accommodation with Havanatur please contact:

Lic. Alexander Socorro  
 Department of Scientific Events and Meetings  
 email: [alexander@havanatur.cu](mailto:alexander@havanatur.cu)  
[biomed@cigb.edu.cu](mailto:biomed@cigb.edu.cu)



# La biotecnología agropecuaria en el siglo XXI

## biotecnología

# habana 2017

**ORGANIZADO POR** Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Habana, Cuba

**SEDE** Centro de Convenciones "Plaza América", Varadero

**HOTEL** Memories Varadero Beach Resort | [www.hotelmemoriesvaradero.com](http://www.hotelmemoriesvaradero.com)



## SIMPOSIOS

### BIOTECNOLOGÍA ACUÁTICA

Se presentarán los más recientes resultados en el estudio del control y la manipulación del crecimiento y el sistema inmune en organismos acuáticos como herramientas para la acuicultura.

Se incluyen los resultados relacionados a inmunos-timulantes, adyuvantes y vacunas para peces. Habrá también conferencias dedicadas a la genómica como herramienta de estudio de la biodiversidad marina y en consecuencia fuente de nuevas moléculas y mecanismos biológicos con aplicación en todas las ramas de la vida.

Coordinadores: Yamila Carpio y Rebeca Martínez.

### APLICACIONES DE LA BIOTECNOLOGÍA PARA EL MEJORAMIENTO DE PLANTAS Y EL USO COMO BIORREACTORES

Este simposio presentará los resultados más recientes de la temática, haciendo énfasis en las principales metodologías y aplicaciones prácticas. Se abordarán los temas relacionados con la resistencia a estrés biótico y abiótico y el uso de plantas como biorreactores. Se discutirán los aspectos relacionados con el impacto, asuntos regulatorios y de percepción pública de las plantas genéticamente modificadas.

Coordinadores: Abel Hernández y Gil Enriquez.

### BIOPRODUCTOS PARA LA AGRICULTURA. ASUNTOS REGULATORIOS Y AGRO NEGOCIOS

Usos actuales y futuros de los bioproductos. Problemas y potencialidades. Desarrollo, producción, formulación y control de la calidad de los bioproductos. Bases moleculares de la acción de los bioproductos. Impacto de la introducción de nuevos bioproductos. Aspectos ecológicos, económicos y legales. Asuntos regulatorios de los productos biológicos de uso agropecuario.

Coordinadores: Rolando Morán y Jesús Mena.

### TECNOLOGÍA DE ENZIMAS

Enzimas y productos enzimáticos con aplicaciones en biotecnología. Los temas a abordar son: producción de enzimas por vía natural y recombinante, ensayos enzimáticos, relación estructura-función, ingeniería de enzimas y evolución dirigida, biocatálisis y bioproceso, biocatalizadores y biorre-actores.

Coordinadores: Lázaro Hernández y Enrique Pérez.

### BIOTECNOLOGÍA MODERNA PARA LA SALUD ANIMAL

Aplicaciones de la biotecnología moderna a la salud animal. Discutiremos sobre vacunas veterinarias y diferentes plataformas para su producción, parasitología y sistemas diagnósticos veterinarios, también sobre ensayos clínicos y pre-clínicos y regulaciones para el registro de productos veterinarios.

Coordinadores: Alina Rodríguez y Marisela Suárez.

### INTERACCIONES PLANTA - PATÓGENO

El simposio enfoca nuevas estrategias para contrarrestar las enfermedades que afectan las plantas. Huanglongbing en los cítricos: herramientas para su manejo. El control de las enfermedades provocadas por geminivirus mediante el silenciamiento viral. El estudio sobre las interacciones planta-bacteria y planta-virus, entre otras, serán temas del debate.

Coordinadores: Alejandro Fuentes y Meilyn Rodríguez.

### INVESTIGACIONES PRECLÍNICAS Y MODELOS ANIMALES

El simposio abordará temas relacionados con el desarrollo de productos biotecnológicos bajo elementos regulatorios preclínicos y con la aplicación de las 3 Rs, el bienestar animal, enriquecimiento ambiental, técnicas de monitoreo no invasivo y desarrollo de modelos animales.

Coordinadores: Jorge Castro y Pedro Puente.

## CURSO PRE-CONGRESO

EDICIÓN DEL GENOMA USANDO LA TECNOLOGÍA CRISPR/CAS9. SU APLICACIÓN A PLANTAS. del 2 al 3 de diciembre de 2017

450.00 euros

### INSCRIPCIÓN

Se incluye alojamiento en habitaciones dobles, desayuno, almuerzo y comida para los dos días del curso.

Los interesados, para ser considerados, deberán enviar su Curriculum y un resumen de su Proyecto de Investigación antes del 1ro. de Agosto del 2017.

### POR 650.00 euros

Ofrecemos el registro al CURSO y a BIOTECNOLOGÍA HABANA 2017 con gastos de alojamiento en habitaciones dobles y la alimentación durante ambos eventos.

sin pasaje aéreo

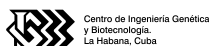
### BECAS PARA ESTUDIANTES SELECCIONADOS

Con financiamiento para este CURSO y la posibilidad de participar en ambos eventos. Más información en: <http://bh2017.cigb.edu.cu/coursegenomediting/fellowships>

LOS GANADORES se publicarán el 15 de agosto del 2017

## FERIA COMERCIAL

El Comité Organizador del evento Biotecnología Habana 2017 tiene el placer de invitarles a participar en la Exposición Comercial de reactivos, materiales, equipos y productos vinculados a la rama biotecnológica, que se celebrará, como parte de este Congreso Internacional, en el hotel Memories Varadero Beach Resort.



del 3 al 6 de  
Diciembre

## INSCRIPCIÓN

HASTA el 31 de julio

450.00 € SECTOR PRIVADO  
350.00 € ACADÉMICOS  
200.00 € ESTUDIANTES  
100.00 € ACOMPAÑANTES

DESPUÉS del 1º de agosto

550.00 € SECTOR PRIVADO  
450.00 € ACADÉMICOS  
250.00 € ESTUDIANTES  
150.00 € ACOMPAÑANTES

## PRESENTACIÓN DE RESÚMENES

Todos los trabajos presentados al Congreso Internacional Biotecnología Habana 2017 serán publicados en forma de Libro de Resúmenes.

Para el envío de los resúmenes usted podrá acceder a la información detallada en nuestra WEB:

<http://bh2017.cigb.edu.cu>

La fecha límite para la presentación de los trabajos será el 1º de agosto de este 2017

### COMITÉ ORGANIZADOR

Presidentes:

Eulogio Pimentel y Mario Pablo Estrada

Secretaría Científica:

Yoslaine Ruiz.

Jefes de Simposios y Programa:

Alina Rodríguez,  
Marisela Suarez, Abel Hernández,  
Gil Enriquez, Jesús Mena,  
Rolando Morán, Lázaro Hernández,  
Enrique Pérez, Alejandro Fuentes,  
Meilyn Rodríguez, Rebeca Martínez,  
Yamila Carpio, Sergio Cruz,  
Jesús Zamora y Raúl Armas.

Información y Acreditación:

Julio Enrique,  
Eliant Lorenzo y Cigry Pérez.

Feria Comercial:

Héctor Machado y Madaisy Cueto.

## PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

PO Box. 6162, Habana 10600, Cuba  
TELÉFONO: +537 2504223 | FAX: +537 2731779  
[bh2017.cigb.edu.cu](http://bh2017.cigb.edu.cu) | <http://bh2017.cigb.edu.cu>



## ARTÍCULO DE REVISIÓN

**El método Clínico: Perspectivas actuales.****The Clinical Method: Current Perspectives.**Adonis Frómata Guerra<sup>1</sup>, Sandra Amalia Sánchez Figueredo<sup>1</sup>, Mónica Alejandra Maya Castro<sup>1</sup>, Jaime Jara Lalama<sup>2</sup>, Diego Vladimir Valarezo Sevilla<sup>1</sup>.

DOI. 10.21931/RB/2017.02.01.8

**RESUMEN**

El método clínico representa los pasos ordenados que todo médico debe aplicar en la búsqueda del diagnóstico definitivo, con un umbral de certeza adecuado. Es equivalente al método científico, pero aplicado al área de las ciencias clínicas. Durante los últimos años se han evidenciado circunstancias que han provocado que no se aplique correctamente, con resultados adversos tanto para el médico, como para el paciente y su familia. En el presente estudio, se realiza una revisión sobre el método clínico, su importancia, principales determinantes, vulnerabilidad y perspectivas actuales.

**Palabras clave:** diagnóstico clínico, medicina clínica, método clínico.

**ABSTRACT**

The clinical method represents the sequential steps every physician should apply while assessing a definite diagnosis, with an adequate certainty threshold. It is equivalent to the scientific method, but applied to clinical science areas. During the last few years, there have been several circumstances where it is not correctly incorporated into the clinical practice, leading to adverse effects not only for the health care professional, but also for the patient and even their family. This study focuses on the clinical method, its importance, key incorporating factors in the clinical process, vulnerability and current perspectives.

**Keywords:** clinical diagnosis, clinical medicine, clinical method

**Introducción**

El método clínico es el proceso sistemático por el cual los médicos logran diagnosticar una enfermedad<sup>1</sup>. Para entender la importancia del método clínico, debe estar claro que el objetivo de la atención al individuo enfermo es la curación<sup>2</sup> y para lograrlo, se debe encontrar el diagnóstico correcto y prescribir el tratamiento adecuado para el problema de salud que adolece el paciente<sup>2</sup>.

Por lo tanto, el método clínico tiene como objetivo el conocimiento del proceso salud-enfermedad del paciente; no sólo involucra el conocimiento clínico sino también epidemiológico y social, ya que, para analizar una enfermedad se debe tomar en cuenta todos los factores asociados al paciente,<sup>3</sup> en el contexto bio-psico-social.<sup>1</sup>

Al involucrar factores del paciente y su entorno, como epidemiología, incidencias y prevalencias de enfermedades, entidades agudas y crónicas, y problemas conductuales del ser humano, entre otros; el método clínico se convierte en un juego probabilístico<sup>3,4</sup>, evita las aproximaciones gestálticas o heurísticas<sup>5</sup>. El método clínico, también llamado proceso de diagnóstico, conserva las técnicas utilizadas para llegar a la confirmación de una hipótesis, a través del interrogatorio, examen físico y razonamiento<sup>1, 2</sup>. Al ser un proceso metódico, sistemático, evita que el médico emita afirmaciones por sentido común o falsas premisas, que, si es verdad, en algunas ocasiones pueden coincidir con la enfermedad del paciente, no es una regla<sup>6</sup>.

En otras palabras, gracias al método clínico se producen conocimientos valerosos y objetivos, cuyo resultado es un conocimiento sistemático y fundamentado<sup>6</sup>. En este contexto, William Osler et al 2012 expone y aún se encuentra en vigencia<sup>7</sup>: “La medicina es ciencia y arte, la ciencia de las probabilidades y el arte de discernir incertidumbre”.

En la actualidad, la medicina basada en la evidencia (MBE) no siempre es bien interpretada y aplicada por algunos profesionales y se obvia la importancia del método clínico como proceso del diagnóstico inherente a la medicina práctica. Ante esta problemática, los autores se proponen con esta revisión caracterizar el método clínico, a partir de la posición que ocupa respecto a la medicina basada en la evidencia.

**DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO CLÍNICO**

El método clínico puede aportar hasta el 95 % del diagnóstico. Es así que a través del interrogatorio se puede llegar al 60 a 70% del diagnóstico, el examen físico añade un 10 a 15%<sup>3,6</sup> y los exámenes complementarios pueden subir esta certeza diagnóstica hasta el 95%.<sup>6,8</sup> Podemos dividir al método clínico en etapas:

**Primera Etapa: Identificación del Problema**

La primera etapa es la identificación del problema. El paciente siente una alteración, que le motiva a buscar al médico<sup>6,8</sup>. Esta motivación debe tenerse siempre en cuenta, incluso cuando son síntomas inespecíficos, problemas de salud desorganizados e indife-

<sup>1</sup> Hospital del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social de Ibarra, Imbabura, Ecuador. Av. Víctor Manuel Guzmán s/n y Brasil.

<sup>2</sup> Hospital pediátrico “Baca Ortiz”, Quito, Ecuador.

**Correspondencia:** adonisfrometaguerra@gmail.com

renciados<sup>3</sup>, pues es una de las piezas fundamentales para llegar a la resolución del problema<sup>6</sup>.

### Segunda Etapa: Búsqueda de Información

La segunda etapa consiste en realizar una búsqueda de información, dirigida y orientada a encontrar datos importantes que lleven a la resolución del problema. La información se obtiene de manera sistemática mediante la anamnesis y el examen físico<sup>6</sup>. Durante el proceso del interrogatorio, se deben analizar el valor de los datos aportados y decidir cuáles son relevantes y cuales merecen ser investigados con mayor profundidad<sup>3</sup>.

El examen físico proporciona la evidencia confirmatoria a favor de una o más posibilidades diagnósticas, por lo cual, más que un examen mecánico, debe ser un examen físico global, pero orientado a apoyar o descartar aquellas ideas diagnósticas que estamos sospechando<sup>1</sup>. No es solamente la técnica la que determina el éxito para detectar hallazgos positivos en el examen físico, sino una mente preparada para percatarse de ellos<sup>9</sup>.

El médico siempre tiene la ventaja que además de estudiar los signos y síntomas de la enfermedad, realizar un examen físico completo, puede estudiar a la persona, al ser humano que la padece y a su familia, su entorno, su estilo de vida y condición sociocultural<sup>6, 8, 10, 11</sup>. Esta información y el análisis subyacente permite identificar factores precipitantes, coadyuvantes o perpetuantes de la afección, aun si no se encuentra la causa<sup>6</sup>.

En el proceso de obtención de información del paciente, el profesional debe considerar el conocimiento que brinda la evidencia científica acerca de la frecuencia de asociación de determinados síntomas y signos con la prevalencia de una afección en una edad, sexo, color de la piel o población determinada, así como sus factores de riesgo y las causas que la provocan.

El diálogo instaurado con el paciente no sólo sirve para guiar la anamnesis y enfocar los demás pasos del método clínico, sino que permite también instaurar una relación médico paciente adecuada<sup>11</sup>, que promueva la confianza y adherencia al tratamiento, además de que por sí sola esta relación tiene un efecto terapéutico<sup>3</sup>.

### Tercera Etapa: Formulación de la hipótesis

Con toda esta información obtenida, el médico ya debería tener una impresión diagnóstica<sup>3</sup>, diagnóstico presuntivo o hipótesis formulada, la cual debería estar basada en la información recogida y tener un fundamento teórico<sup>6</sup>. Esta hipótesis diagnóstica es importante porque enmarca las acciones futuras que llevarán como paso final a la resolución del problema<sup>5</sup>.

Los siguientes principios se deben tener en cuenta a la hora de analizar toda la información y construir un diagnóstico presuntivo<sup>9</sup>:

1. Hacer un resumen objetivo del caso clínico.
2. Ordenar la información.
3. Jerarquizar los síntomas y signos de acuerdo con su sensibilidad, especificidad, valor predictivo, importancia relativa según la fisiopatología de la enfermedad, potencial gravedad, etc.
4. Agrupar los signos y síntomas encontrados, si es posible en síndromes.
5. No agrandar el diagnóstico, ni crear síndromes artificiales.
6. Ir del síntoma al síndrome, no viceversa.
7. Analizar la enfermedad en la persona.
8. Jugar con las probabilidades: "Pensar siempre en lo frecuente, pero sin olvidar lo raro"
9. Recordar que se investiga una enfermedad en una persona, no se investigan enfermedades en un libro.

Se han descrito algunos métodos inconscientes por los cuales los médicos agrupan a información y generan sus hipótesis:<sup>5</sup>

1. Aproximación gestáltica: Al observar elementos como síntomas o signos, el médico se forma una imagen mental de lo que puede estar ocurriendo. Este método tiene más probabilidad

de error, sin embargo, tiene mayor precisión en médicos con mayor experiencia, debido a que aumenta la batería de experiencia que le permite comparar. Ejemplo: Paciente con dolor abdominal localizado en fosa iliaca derecha: apendicitis.

2. Aproximación heurística: es un método no riguroso, que permite simplificar el proceso necesario para llegar a una solución, en algo más simple, es una especie de atajo mental. Es característico anclar o ajustar síntomas y buscar compatibilidad con una enfermedad, como un rompecabezas. Uno de los problemas más grandes es que no considera probabilidades o prevalencia de la condición. Ejemplo: Paciente con hemiparesia catalogado como accidente cerebrovascular a pesar de tener 10 años de edad.

3. Método de la probabilidad previa o prevalencia del cuadro: El médico toma en cuenta la información recopilada previamente, de manera objetiva y numérica, contrastando con las prevalencias de las enfermedades en la población local.

En base al estudio de la información del paciente y la población, se toma en cuenta la probabilidad pretest y postest de la prueba a realizar. La probabilidad *pretest* es la probabilidad de que se llegue a una conclusión sólo con la información que se dispone hasta el momento y la probabilidad *postest* es la probabilidad de llegar a la conclusión posterior a realizar exámenes complementarios.

Este método permite trabajar con información precisa y es uno de los elementos iniciales para la aplicación de la Medicina Basada en Evidencia.

Precisamente se establece una de las grandes diferencias entre el método clínico basado en atención razonada e individualizada al paciente y MBE<sup>12</sup> con un enfoque poblacional y su objetivo primordial es la generalización y la mejora de los resultados sanitarios en el promedio de los pacientes.

Aunque todos los médicos en alguna ocasión, realicen aproximaciones gestálticas o heurísticas para realizar presunciones diagnósticas y llegar al diagnóstico definitivo correcto, no debería ser la regla. Todo estudiante de medicina y médico formado debería usar el método de la probabilidad previa o prevalencia del cuadro, recomendaciones según MBE confluyendo las dos corrientes como métodos científicos, para llegar a crear una hipótesis diagnóstica fundamentada y valedera<sup>5</sup>.

### Cuarta Etapa: Contrastación del diagnóstico

La cuarta fase es someter a contrastación el diagnóstico presuntivo, el cual se realiza programando de manera enfocada una diversidad de pruebas diagnósticas (laboratorio, imagen, anátomo patológicas, etc.)<sup>3, 6</sup>.

Los exámenes complementarios son importantes debido a que disminuyen el área de incertidumbre<sup>5</sup>. Además:

1. Pueden confirmar o rechazar las hipótesis planteadas
2. Pueden ampliar el conocimiento sobre la enfermedad del paciente, brindar datos importantes sobre la causa, extensión, localización del daño, magnitud del proceso o afectación orgánica, aspectos muy importantes a la hora de conocer el pronóstico y tomar decisiones terapéuticas asociadas.
3. Contribuyen a excluir posibilidades diagnósticas.

La decisión de enviar un examen complementario requerido, debería basarse en la urgencia del caso (tiempo disponible), la magnitud del aporte a la precisión del tratamiento, factibilidad técnica y contraindicaciones para realizar el procedimiento<sup>4</sup>.

El médico también debe conocer cómo interpretar el examen, los límites de la normalidad, causas de falsos positivos<sup>9</sup>, falsos negativos y tenerlos en cuenta a la hora de encontrarse con el paciente<sup>4</sup>.

### Quinta Etapa: Exposición de resultados: Diagnóstico definitivo

La hipótesis diagnóstica se aprueba o rechaza con la realización de exámenes complementarios<sup>8</sup>, aunque debe recalarse

que en algunas ocasiones no es necesario realizarlos para llegar al diagnóstico definitivo<sup>4</sup>.

En los casos que se rechace la hipótesis, se reinicia el método, convirtiéndose en un proceso en espiral<sup>3,10</sup>. Es lógico que, si la identificación del problema y la búsqueda de información fueron deficientes, pues la hipótesis no tendrá posibilidad de comprobarse<sup>8</sup>.

### Elementos que intervienen para llegar a un diagnóstico correcto

Como se expuso en la tercera etapa, el método mental que se debería usar al momento de crear una hipótesis diagnóstica, es el método de las probabilidades.

Se debe tomar en cuenta que el proceso de análisis de datos, probabilidad *pretest*, test, probabilidad *postest* no es único, pues en ocasiones la probabilidad *postest* no es suficientemente fuerte como para eliminar la incertidumbre y afirmar que se ha llegado al diagnóstico definitivo.

Entonces, durante este proceso intuitivamente se repite nuevamente todo el método clínico, recopilando e incorporando nueva información, hasta que el nivel de certeza sea tan alto como para descartar o apoyar un diagnóstico<sup>5</sup>. El nivel de certeza adecuado para confirmar o excluir un diagnóstico se llama "Umbral de decisión", mientras que el punto sobre el cual no requerimos más información ni exámenes complementarios, porque tenemos un diagnóstico y vamos a iniciar el manejo concordante, se llama "Umbral terapéutico". Aquel por debajo del cual dejamos de requerir nuevos test porque estimamos que la probabilidad es tan baja que no se justifica, se llama "Umbral de estudio adicional". Estos umbrales de decisión no son fijos para todas las patologías ni para todos los pacientes, sin embargo, debería tenerse en cuenta siempre este esquema cuando valoramos uno, tal como se muestra en la figura 1.

Siempre que nos encontremos en un punto medio entre el umbral de estudio adicional y el umbral terapéutico, requeriremos nuevos exámenes complementarios para disminuir la incertidumbre o desechar completamente la hipótesis diagnóstica. Una correcta estimación de la probabilidad *pretest* y un adecuado conocimiento del rendimiento de los test a utilizar, nos permitirán realizar este proceso más eficiente<sup>5</sup>.

### Calidad en el proceso diagnóstico

Este enfoque integral es un proceso obligado que todo médico debería realizar dentro del análisis diagnóstico<sup>3</sup>, para realizarlo con calidad debería cumplir con los siguientes requisitos<sup>6,13</sup>.

1. La información que se recoge debe ser real.
2. Los problemas de salud deben estar bien identificados
3. La o las hipótesis diagnósticas deben estar bien preci-

sadas.

4. La indicación de los exámenes complementarios debe estar justificada

5. La conducta terapéutica debe estar basada en el diagnóstico y adecuadamente fundamentada

6. El paciente debe ser informado sobre su condición de salud y opciones terapéuticas a seguir. El paciente debe demostrar conformidad con el tratamiento propuesto.

7. La evaluación (exposición de resultados) en la historia clínica, debe expresar el pensamiento científico y análisis del médico.

8. El egreso debe ser un resumen de cada problema del paciente y de las orientaciones médicas para darles solución.

Actualmente, el Centro de Estudios de Medicina Familiar IanMcWhinney, en Argentina, ha propuesto una serie de pautas para involucrar al paciente de manera activa dentro del proceso diagnóstico y terapéutico. Las variaciones se conocen como el Método Clínico Centrado en el Paciente (MCCP) e involucran los siguientes componentes<sup>11</sup>:

1. Comprender integralmente a la persona en un contexto bio-psico-social.

2. Explorar y entender la dolencia desde el punto de vista del paciente: investigar la dimensión humana de la experiencia de la enfermedad, nivel de aceptación y adaptación por parte del paciente, adherencia a tratamientos previos si existieran, así como ideas, vivencias y sentimientos en torno a la condición actual.

3. Encontrar un campo común entre el médico y el paciente, en relación al manejo del problema de salud.

4. Incorporar la promoción de la salud y la prevención.

5. Reforzar la relación médico paciente

6. Uso realista del tiempo y los recursos, en el contexto de cada individuo y el lugar donde se encuentran.

## MÉTODO CLÍNICO Vs MEDICINA BASADA EN EVIDENCIA

El método se define como "Un proceso sistemático que lleva a conocer la realidad objetiva, mediante aproximaciones sucesivas."<sup>14,15</sup> El método científico es un método general, constituido por una serie de etapas necesarias en el desarrollo de toda investigación científica, en la forma de abordar la realidad y estudiar los fenómenos que se producen en la vida con el propósito de descubrir<sup>14</sup>. Un aspecto muy importante del método científico es que se contrapona a todo pensamiento espontáneo, instintivo y casual<sup>15</sup>.

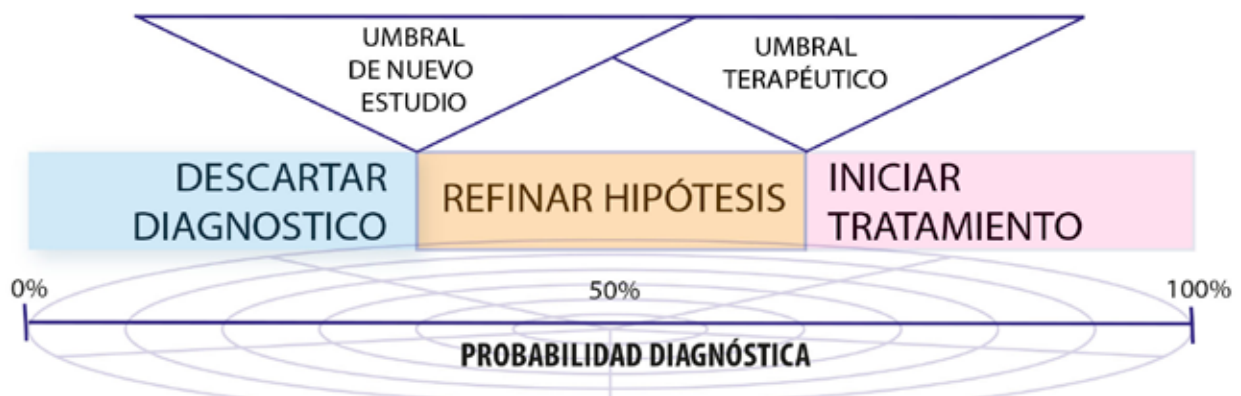


Figura 1. Umbrales de decisión en la formulación de hipótesis para el diagnóstico correcto según probabilidades. Fuente: Adaptado de Capurro., 2007. 5



Se puede apreciar que tanto el método clínico como la medicina basada en evidencia cumple los criterios y procesos para ser considerados como métodos científicos.

El método clínico es el método científico aplicado a las ciencias clínicas y psicológicas<sup>16</sup> en el estudio del proceso salud enfermedad. En otras palabras, el método clínico no es más que el método científico aplicado al trabajo con cada paciente, a una escala observacional y experimental<sup>6,13</sup>.

Sacristán<sup>12</sup> hace referencia a las diferencias y semejanzas de la medicina basada en evidencia y la medicina centrada en el paciente que no es más que el método clínico.

## VULNERABILIDAD DEL MÉTODO CLÍNICO

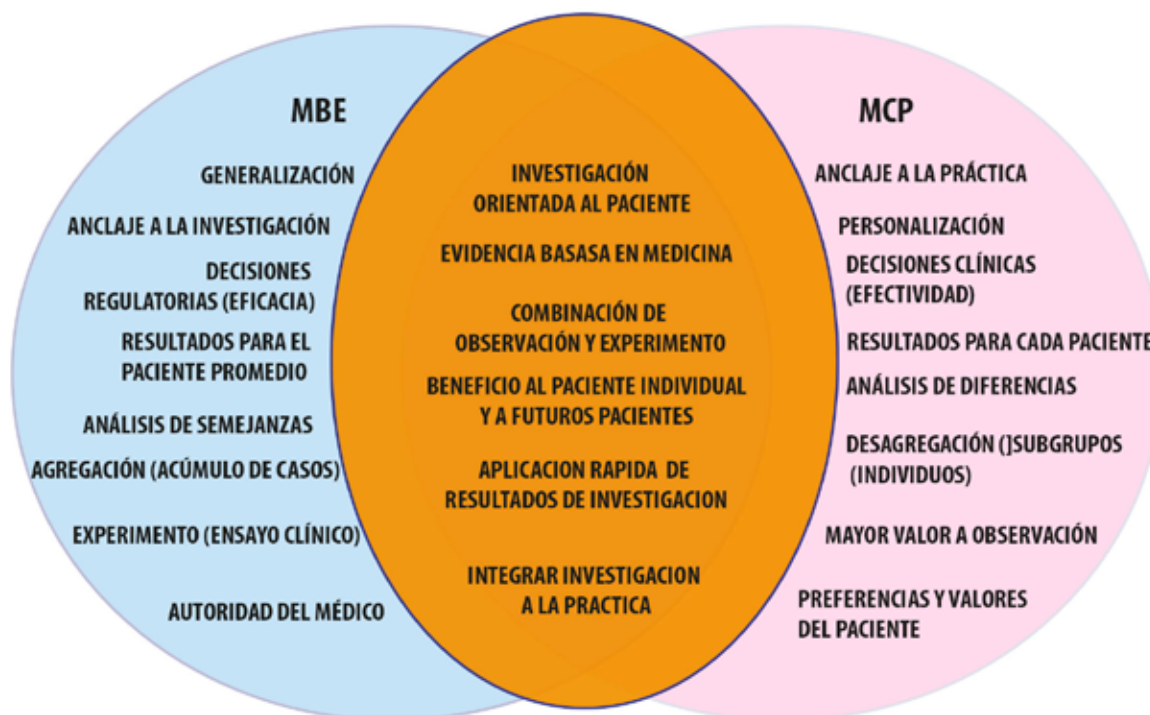
Actualmente, hay una crisis del método clínico, debido a un progresivo menosprecio de la clínica asociado a una creciente debilidad en el desarrollo de habilidades semiológicas y clínicas<sup>17</sup>, sobrevaloración de la tecnología<sup>10</sup>, falta de tiempo en la consulta médica y desinterés por entablar una buena relación médico paciente<sup>13,18</sup>.

“Todo médico debe tener la misma base teórica y conceptual de la medicina...”. Sin embargo, en la actualidad los médicos no tienen la misma base teórica y conceptual, cada vez más los estudiantes y residentes jóvenes optan por saltarse etapas fun-

De cualquier forma, es preocupante observar cómo se han dejado a un segundo plano las prácticas semiológicas tradicionales y cada vez más, los médicos se aferran a prescribir deliberadamente exámenes para encontrar un diagnóstico, sin previamente haber realizado el ejercicio ordenado y metódico que lleve a tener presunciones diagnósticas<sup>2</sup>. Incluso, algunos médicos actúan como si las técnicas complementarias sustituyeran al pensamiento y consideran innecesario hacer presunciones diagnósticas previas<sup>6</sup>.

En este momento en donde médico, y porque no decirlo, los pacientes, sobrevaloran el uso de la tecnología y hasta reclaman estudios más costosos<sup>3</sup>, a veces respaldándose que entre más complejidad hay más calidad<sup>8</sup>, debemos recordar que han habido avances increíbles en el ámbito tecnológico y se han creado recursos diagnósticos y terapéuticos valiosos<sup>2</sup>, que los exámenes complementarios son una fase importantísima en el proceso diagnóstico del paciente, sin embargo no es la única etapa y nunca debería decirnos por sí sólo el diagnóstico<sup>3</sup>.

Debe tenerse siempre presente que la realización de exámenes complementarios conlleva una responsabilidad económica extra ya sea para el paciente o para el estado, expone al paciente a complicaciones e iatrogenias<sup>8</sup>, ansiedad y pérdida de tiempo del



**Figura 2.** Comparación del Método clínico o Medicina Centrada en el Paciente (MCP) vs medicina basada en evidencia (MBE) se muestra las diferencias y la complementación de ambos procesos. Fuente: Sacristán., 2013<sup>16</sup>.

damentales del método clínico para llegar sólo a la realización de exámenes<sup>3</sup>.

En otras ocasiones realizan el proceso de identificación del problema, búsqueda de información, sin embargo, obvian la etapa del análisis de la información y formulación de hipótesis diagnóstica<sup>19</sup> y como resultado, se realizan una cantidad de exámenes complementarios innecesarios y sin fundamentación<sup>1,6,20</sup>.

Algunos autores señalan que este problema se basa en que los programas y planes de estudios no brindan a los estudiantes, conocimientos detallados de cómo se realiza el razonamiento diagnóstico y los estudiantes aprenden empíricamente, viéndolo hacer y copiando a los residentes mayores, que tampoco lo hacen adecuadamente<sup>9</sup>. También hay que considerar la falta de tiempo, desinterés y pereza de los médicos que si conocen las técnicas y sin embargo no lo realizan<sup>13</sup>.

paciente y/o familiares<sup>3</sup>. Con esta situación, hay pacientes que pueden sentir desapego, falta de relación empática con su médico, sentirse ansiosos, ignorados o explotados económicamente y no seguir el tratamiento, así este sea el correcto, mientras que el médico puede perder la capacidad de comunicarse, transmitir interés, confianza y esperanza<sup>8</sup>. Es más, toda prescripción o práctica que no esté basada en un análisis previo y este pueda ser reproducible, se hace vulnerable a la mala práctica médica, ya que ninguna técnica puede sustituir aún al pensamiento humano<sup>6</sup>.

En la figura 3, se resumen los principales factores que han propiciado la vulnerabilidad del método clínico:

Además del problema previamente expresado y a partir de la realidad que se ha vivido a finales del siglo XX e inicios del XXI, varios autores han llamado la atención sobre la aparición de dos síndromes, cada vez más frecuentes en la práctica clínica actual:

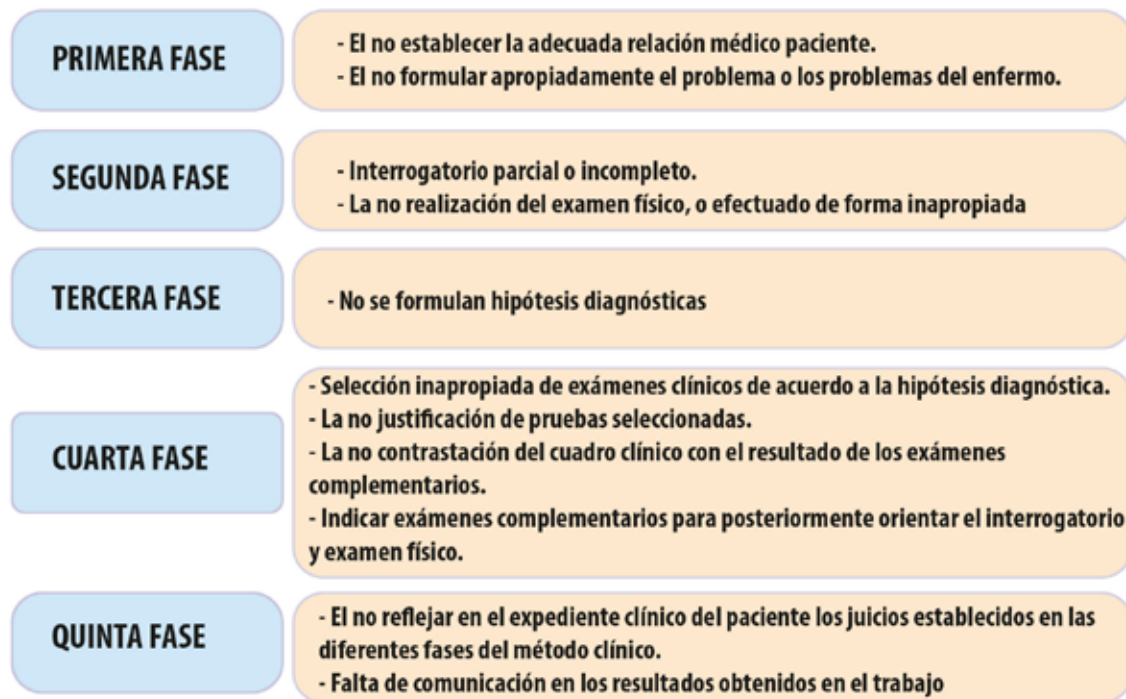


Figura 3. Fuente: Adaptado de Ilizástigui., 2010<sup>6</sup>. (La vulnerabilidad del método clínico en todas sus fases son inherentes al médico).

### 1. Síndrome de la neblina informativa

El síndrome de la neblina informativa consiste en “no ver lo que hay frente a sus ojos y ver lo que no hay.”<sup>21</sup>

Se produce cuando no se cumplen las etapas fundamentales del método clínico, por lo que se prescriben exámenes complementarios precipitados, incompletos o se repiten<sup>21</sup>, luego se reciben resultados, sin una base para analizarlos. Como resultado, puede haber un porcentaje de falsos positivos y falsos negativos que el médico no sabe que se han producido, no puede disminuir la incertidumbre y no debería afirmar que ha llegado a un umbral de certeza<sup>17,21</sup>. De no disponerse de una buena hipótesis diagnóstica, se hace confusa e indistinguible la identificación de cuál es la enfermedad y cual no<sup>17</sup>.

### 2. Síndrome de hipocompetencia clínica

Este síndrome está provocado por la pérdida paulatina de habilidades semiológicas y clínicas<sup>8</sup>, con deterioro en la entrevista médica, observaciones, análisis, juicio clínico y acción del médico<sup>21</sup>.

La situación empeora por el desinterés progresivo de los médicos por el paciente y el exceso de confianza en la tecnología, como ya se citó anteriormente<sup>21</sup>.

En 1984, Beckman y Frankel estudiaron la actitud de los médicos al escuchar a los enfermos. Los resultados fueron devastadores. Según la investigación, el médico paraba de escuchar al paciente en promedio a los 18 segundos de haber comenzado a hablar y en ocasiones, cuando sólo habían hablado 5 segundos. Solo el 20% de los pacientes pudo completar el relato de sus quejas.<sup>11</sup> Este estudio, realizado hace casi 30 años, demuestra la poca predisposición del médico para escuchar al paciente.

Si no se escucha al paciente, no existe una comunicación adecuada, por lo tanto, el paciente se siente desatendido, no tiene confianza sobre el médico y por lo tanto no se establece una buena relación médico paciente. Como resultado, el paciente no colaborará lo suficiente en la atención de su proceso, es posible que no tenga adherencia al tratamiento o ni siquiera lo tome<sup>22</sup>.

### PERSPECTIVAS ACTUALES

No existen razones para abandonar el método clínico, todo lo contrario. El médico debe intentar actuar científicamente,

emplear esa batería de conocimientos para realizar un análisis exhaustivo de los problemas de salud del paciente, luego realizar exámenes complementarios para aprobar o rechazar su hipótesis<sup>6</sup> y a su vez, conocer la validez del test que realiza, su valor predictivo positivo y negativo, para según eso, tomar decisiones<sup>3</sup> diagnósticas, terapéuticas y pronósticas<sup>1</sup>.

Sólo comprendiendo el valor y la importancia del método clínico, usándolo y enseñando su uso a las futuras generaciones<sup>6, 8, 17</sup>, se podrá evitar que los médicos sólo usen el sentido común y nos convirtamos en mecánicos e irracionales, puros prescriptores de exámenes desarticulados e imprecisos<sup>23</sup> y revisores de resultados<sup>6</sup>. Nos deberíamos preguntar: ¿Si abandonamos el método clínico, que nos diferenciará de una computadora o un programa?

Se recomienda no ignorar todos los avances tecnológicos, sino aprovecharlos, sin dejar de lado el análisis previo, revisar la evidencia actual que nos compete<sup>23</sup>, encontrando un proceso más eficiente, eficaz y seguro tanto para el paciente como para el médico<sup>1</sup>, recordando que el diagnóstico es la base fundamental de la atención a los pacientes y premisa indispensable para instaurar una terapéutica eficaz<sup>10</sup>, también la base para instaurar una buena relación médico paciente, demostrar interés, explicar al paciente su patología y entablar la confianza necesaria para que haya adherencia al tratamiento<sup>23</sup>.

Como plantea Ilizástigui 2010: “El afianzamiento, el refinamiento y su desarrollo integral son indispensables para llenar las necesidades de la clínica, para el presente y para el futuro”.<sup>3</sup>

### Conclusiones

El método clínico es un eslabón fundamental durante el proceso diagnóstico del paciente enfermo, al ser un proceso sistemático, ordenado, reproducible y que evita que el médico realice afirmaciones al azar o por sentido común.

El método clínico permite estudiar no solamente a la enfermedad del paciente, sino al ser humano mismo, desde un punto de vista bio-psico-social.

La clínica, la semiología, las habilidades semiotécnicas y el método clínico, deben continuar enseñándose en las escuelas de medicina, haciendo énfasis en la importancia que tienen para el

adecuado desempeño profesional, siendo enriquecida con la medicina basada en evidencia o mejor dicho la mejor evidencia de la medicina.

El método clínico y la medicina basada en evidencia no son corrientes antagónicas, sino la aplicación de ambos métodos eleva la certeza diagnóstica del paciente y a su vez mejora la atención de pacientes futuros.

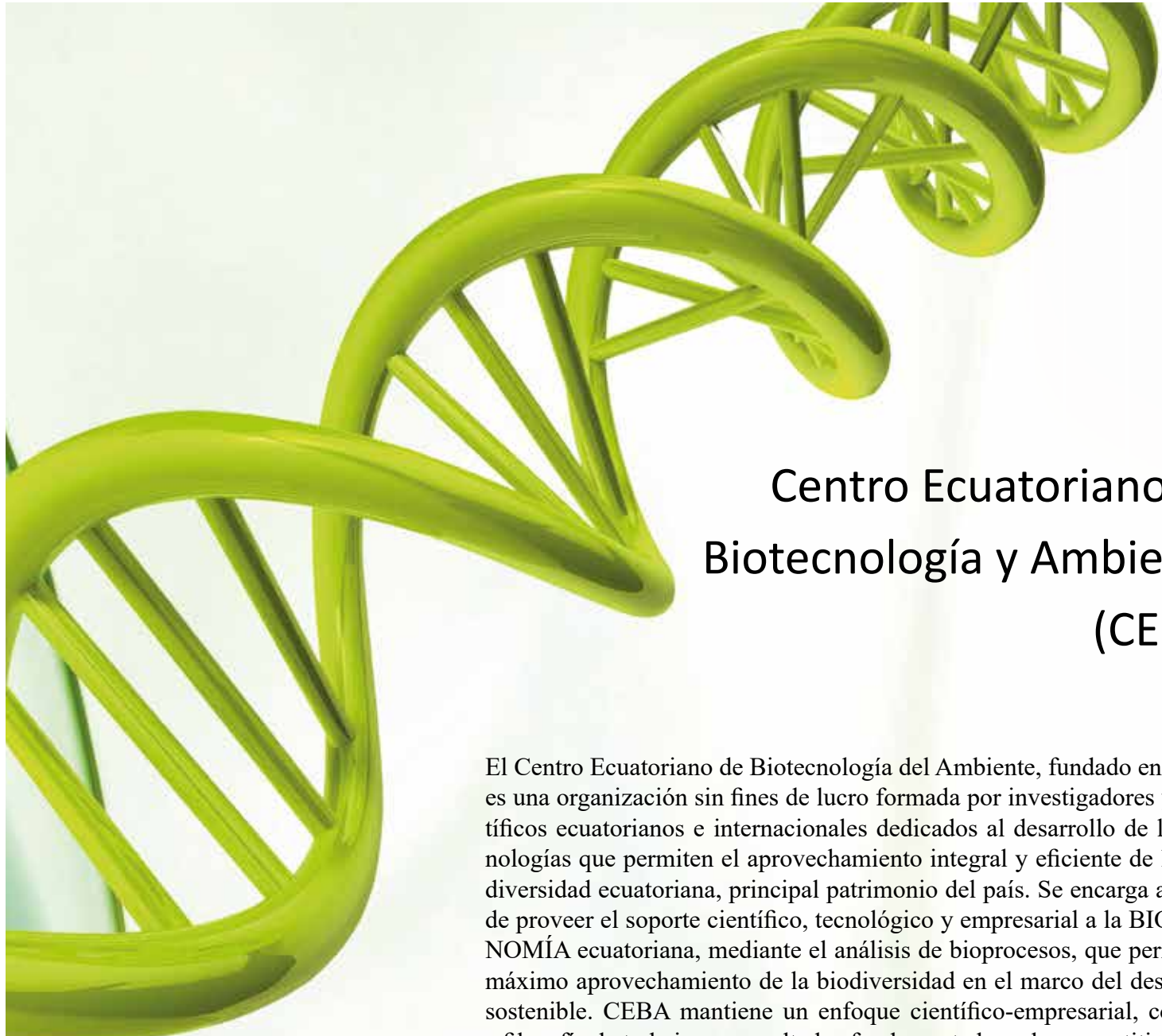
## Referencias bibliográficas

1. Ilizástigui Dupuy F. El método clínico: muerte y resurrección. *MediSur* [revista en Internet]. 2010 [citado 2016 Nov 23]; 8(52):62. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180020098010>.
2. Corona-Martínez L. El método clínico como un método para el diagnóstico médico. Crítica a una concepción vigente. *Medisur* [revista en Internet]. 2010 [citado 2016 Nov 23]; 8(5):[aprox. 3 p.]. Disponible en: <http://medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/1324/6080>
3. Álvarez-Sintes R. El método clínico en la práctica de la medicina familiar. *Medisur* [revista en Internet]. 2010 [citado 2016 Nov 23]; 8(5):[aprox. 7 p.]. Disponible en: <http://medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/1337>
4. Corona-Martínez L. Los exámenes complementarios en la práctica médica asistencial. Algunas consideraciones útiles para el médico en formación. *Medisur* [revista en Internet]. 2010 [citado 2016 Nov 23]; 8(5): [aprox. 2 p.]. Disponible en: <http://medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/1348>
5. Capurro N Daniel, Rada G Gabriel. El proceso diagnóstico. *Rev. méd. Chile* [revista en Internet]. 2007 [citado 2016 Nov 23]; 135(4): 534-538. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872007000400018&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872007000400018&lng=es). <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872007000400018>.
6. Ilizástigui Dupuy F, Rodríguez Rivera L. El método clínico. [revista en Internet]. *MediSur* 201082-11. 2010 [citado 2016 Nov 23]. Disponible en: <http://google.redalyc.org/articulo.oa?id=180020098002>
7. Young Pablo, Finn Bárbara C, Bruetman Julio E, Emery John D. C, Buzzi Alfredo. William Osler: el hombre y sus descripciones. *Rev. méd. Chile* [revista en Internet]. 2012 Sep [citado 2016 Nov 23]; 140(9): 1218-1227. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872012000900018&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872012000900018&lng=es). <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872012000900018>
8. Arteaga Herrera J, Fernández Sacasas JA. El método clínico y el método científico. *Medisur*. [revista en Internet]. 2010 [citado 2016 Nov 23]; 8(5):12-20. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1800/180020098003.pdf>
9. Díaz Novás José, Gallego Machado Bárbara, León González Aracelys. El diagnóstico médico: bases y procedimientos. *Rev Cubana Med Gen Integr* [revista en Internet]. 2006 Mar [citado 2016 Nov 23]; 22(1):. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-21252006000100007&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252006000100007&lng=es)
10. Díaz Novás José, Gallego Machado Bárbara Rosa, Calles Calviño Adela. Bases y particularidades del método clínico en la atención primaria de salud. *Rev Cubana Med Gen Integr* [revista en Internet]. 2011 Jun [citado 2016 Nov 23]; 27(2): 232-244. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-21252011000200011&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252011000200011&lng=es).
11. Cruz Hernández Jeddú, Hernández García Pilar, Abraham Marcel Enrique, Dueñas Gobel Nancy, Salvato Dueñas Alena. Importancia del Método Clínico. *Rev Cubana Salud Pública* [revista en Internet]. 2012 Sep [citado 2016 Nov 23]; 38(3): 422-437. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-34662012000300009&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662012000300009&lng=es).
12. Sacristán J. Medicina basada en la evidencia y medicina centrada en el paciente: algunas reflexiones sobre su integración. *Revista Clínica Española* [revista en Internet]. 2013 [citado 2016 Nov 23]; 213(9):460-464. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/259086959\\_Medicina\\_basada\\_en\\_la\\_evidencia\\_y\\_medicina\\_centrada\\_en\\_el\\_paciente\\_algunas\\_reflexiones\\_sobre\\_su\\_integracion](https://www.researchgate.net/publication/259086959_Medicina_basada_en_la_evidencia_y_medicina_centrada_en_el_paciente_algunas_reflexiones_sobre_su_integracion)
13. Bacallao Martínez G, Medina B. El método clínico, situación actual. Revisión bibliográfica. [Internet]. *Acta Médica del Centro* [revista en Internet]. 2014 [citado 2016 Nov 23]; 8(2):131-8. Disponible en: <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDARTICULO=50461>
14. Hernández Hernández Roberto. Del método científico al clínico: Consideraciones teóricas. *Rev Cubana Med Gen Integr* [revista en Internet]. 2002 Abr [citado 2016 Nov 23]; 18(2):161-164. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-21252002000200011&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252002000200011&lng=es).
15. Hernández-Aragón J. La vulnerabilidad del método clínico. *Medisur* [revista en Internet]. 2010 [citado 2016 Nov 23]; 8(5): [aprox. 9 p.]. Disponible en: <http://medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/1339>
16. García Palacios M, Castorina J. Método clínico-crítico y etnografía en investigaciones sobre conocimientos sociales [revista en Internet]. *Cadernos De Pesquisa*. [citado 2016 Nov 23]; 44(154):1052-68. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-15742014000401052&script=sci\\_arttext&lng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-15742014000401052&script=sci_arttext&lng=es)
17. Vidal Ledo María, Fernández Sacasa José A. Medicina basada en la evidencia: Reflexiones sobre el tema. *Evidence-based medicine: Reflexions on the topic*. *Educ Med Super* [revista en Internet]. 2005 [citado 2016 Nov 23]; 19(1): 1-1. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-21412005000100010&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21412005000100010&lng=es).
18. Espinosa Brito A. La clínica y la medicina interna. Apuntes históricos y proyecciones (primera parte: "el pasado"). *Fórum de ciencia y técnica* [revista en Internet]. 2006 [citado 2016 Nov 23]. Disponible en: <http://www.forumcyt.cu/UserFiles/forum/Textos/0601899.pdf>
19. Díez E, Cotera M d l, El diagnóstico médico, problema crucial en el siglo XXI. *MediSur* [revista en Internet]. 2010. [citado 2016 Nov 23]; 121-130. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180020098022>.
20. Hernández-Sosa L, Pérez-García S, Casanova-González M. El método clínico en pediatría. *Medisur* [revista en Internet]. 2010 [citado 2016 Nov 23]; 8(5):[aprox. 2 p.]. Disponible en: <http://medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/1378>
21. Valdés-Suárez O. LA MEDICINA INTERNA Y EL MÉTODO CLÍNICO: PASADO, PRESENTE Y FUTURO. *Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias* [revista en Internet]. 2014 [citado 2016 Nov 23]; 13(4): [aprox. 0 p.]. Disponible en: <http://www.revmie.sld.cu/index.php/mie/article/view/41>
22. García-Núñez R. El método clínico en la Atención Primaria de Salud: algunas reflexiones. *Medisur* [revista en Internet]. 2010 [citado 2016 Nov 23]; 8(5):[aprox. 11 p.]. Disponible en: <http://medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/1338>
23. Falcón-Hernández A, Navarro-Machado V. El método clínico y la medicina basada en la evidencia. Algunas consideraciones. *Medisur* [revista en Internet]. 2010 [citado 2016 Nov 23]; 8(5): [aprox. 2 p.]. Disponible en: <http://medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/1341>

**Recibido:** diciembre 2016

**Aprobado:** enero 2017





## Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA)

El Centro Ecuatoriano de Biotecnología del Ambiente, fundado en 2009, es una organización sin fines de lucro formada por investigadores y científicos ecuatorianos e internacionales dedicados al desarrollo de las tecnologías que permiten el aprovechamiento integral y eficiente de la Biodiversidad ecuatoriana, principal patrimonio del país. Se encarga además de proveer el soporte científico, tecnológico y empresarial a la BIOECONOMÍA ecuatoriana, mediante el análisis de bioprocesos, que permita el máximo aprovechamiento de la biodiversidad en el marco del desarrollo sostenible. CEBA mantiene un enfoque científico-empresarial, con una filosofía de trabajo por resultados fundamentada en la competitividad. CEBA promueve y apoya toda labor encaminada a la preservación del medio ambiente y los diferentes ecosistemas participando en proyectos que buscan estudiar, monitorear o proteger el medio ambiente del mal uso o la degradación que implica el accionar humano. Las actividades de CEBA pueden ir desde realizar campañas informativas utilizando la plataforma de la Revista Bionatura y conferencias y apoyar la consecución de proyectos económicos sustentables.

Julio Pineda Insuasti, PhD

Director Ejecutivo

Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente

Calle Bolívar 13-118 (Of.11) y Av. Teodoro Gómez De la Torre

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

[www.ceba.one](http://www.ceba.one),

Ibarra-Ecuador



Calle Bolivar 13 -118 y Ave. Teodoro Gómez,

[cebaecuador@gmail.com](mailto:cebaecuador@gmail.com)

Cel. +593995797813







ARTÍCULO DE REVISIÓN

## The Impact of Endocrine Disrupting Chemicals on the Environmental and their Potential Biotransformation by White-rot Fungi and their Oxidative Enzymes

El impacto de los compuestos disruptores endocrinos sobre el medio ambiente y su potencial biotransformación por hongos de pudrición blanca y sus enzimas oxidativas

Roberto Taboada-Puig<sup>1\*</sup>, Maria Teresa Moreira<sup>2</sup>, Spiros N. Agathos<sup>1</sup>, Juan M. Lema<sup>2</sup>

DOI. 10.21931/RB/2017.02.01.9

### ABSTRACT

The search of new technologies suitable for the treatment of wastewater containing endocrine disrupting chemicals (EDCs) such as bisphenol A (BPA), triclosan (TCS), estrone (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2) and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) is a challenge since existing traditional wastewater treatment plants (WWTPs) are not able to eliminate them completely. Even at concentrations of ng/L, EDCs have an impact in the endocrine system of the fauna producing morphological deformities, reduced overall growth, reduced sperm quality and delayed ovulation, sex reversal male to female, among others. Efforts have been put in the study of different post-treatments to remove the residual concentration of EDCs present in WWTP effluents. The most frequently used technologies are advanced oxidation processes (AOPs) such as photocatalysis, photodegradation, sonolysis, ozonolysis, amongst others. In general, these processes have high degradation rate but they have low selectivity and high costs. In addition, AOPs can be a cause of concern itself since they may render harmful by-products or transformation products which can have similar or increased estrogenicity of that of the parent compound. A biological alternative may be use of white-rot fungi (WRF) or their lignin modifying enzymes (LMEs) to treat wastewater containing EDCs. From an operational point of view, the use of LMEs in *in vitro* systems, compared to the use of WRF in *in vivo* systems, is easier and cheaper since no aseptic conditions are needed. Among the LMEs, laccase is the most extensively studied enzyme for the degradation of BPA, TCS, E1, E2 and EE2 whereas peroxidases (LiP, MnP and VP) have not been studied in such level of detail.

**Keywords:** endocrine disrupting chemicals; white-rot fungi; lignin modifying enzymes; estrogenic activity.

### RESUMEN

La búsqueda de nuevas tecnologías adecuadas para el tratamiento de aguas residuales que contienen compuestos disruptores endocrinos (CDE), tales como bisfenol A (BPA), triclosán (TCS), estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2) y 17 $\alpha$ -etilnilestradiol (EE2) es un reto, ya que las plantas tradicionales de tratamiento de aguas residuales tradicionales (EDAR) no son capaces de eliminarlas completamente. Incluso en concentraciones de ng/L, los CDEs tienen un impacto en el sistema endocrino de los animales produciendo deformidades morfológicas, reducción del crecimiento general, reducción de la calidad espermática y retraso de la ovulación, inversión sexual masculina a femenina, entre otros. Los esfuerzos se han enfocado en el estudio de diferentes post-tratamientos para eliminar la concentración residual de los CDEs presentes en los efluentes de la EDAR. Las tecnologías más empleadas son los denominados procesos de oxidación avanzada (POAs) tales como fotocatalisis, fotodegradación, sonolisis, ozonolisis, entre otros. En general, estos procesos tienen una alta tasa de eliminación pero tienen baja selectividad y alto coste. Además, los POAs pueden producir subproductos dañinos o productos con una estrogenicidad similar o mayor que la del compuesto inicial. Una alternativa biológica puede ser el uso de hongos de podredumbre blanca (HPB) o sus enzimas modificadoras de lignina (EML) para tratar aguas residuales que contienen CDEs. Desde un punto de vista operativo, el uso de EMLs en sistemas *in vitro*, en comparación con el uso de HPBs en sistemas *in vivo*, es más fácil y más barato ya que no se necesitan condiciones asépticas. Entre las EMLs, la lacasa es la enzima más ampliamente estudiada para la degradación de BPA, TCS, E1, E2 y EE2, mientras que las peroxidases (LiP, MnP y VP) no se han estudiado en tanto detalle.

**Palabras clave:** compuestos disruptores endocrinos; hongos de podredumbre blanca; enzimas modificadoras de lignina; actividad estrogénica.

## INTRODUCTION

### Endocrine disrupting chemicals

Since the end of the 1990 there has been a growing concern about the exposure to substances which are suspected to interfere with the endocrine system, and thus, may cause health effects such as cancer, behavioural changes and reproductive abnormalities in human beings and wildlife.

Many of the thousands of anthropogenic chemicals currently released into the environment are endocrine disrupting compounds (EDCs). These are defined as “a group of chemicals (natural, synthetic, industrial chemicals or by-products) present in the environment and suspected to alter the functions of the endocrine system and, consequently, causing adverse health effects in an intact organism, or its offspring or (sub) population”<sup>1</sup>. Figure 1 shows the main distribution of EDCs in the environment.

<sup>1</sup> School of Biological Sciences and Engineering, Yachay Tech University, Hacienda San José s/n y Proyecto Yachay, San Miguel de Urququí, Ecuador.

<sup>2</sup> Department of Chemical Engineering, Institute of Technology, University of Santiago de Compostela, E-15782, Santiago de Compostela, Spain.

**Correspondencia:** rtaboada@yachaytech.edu.ec.



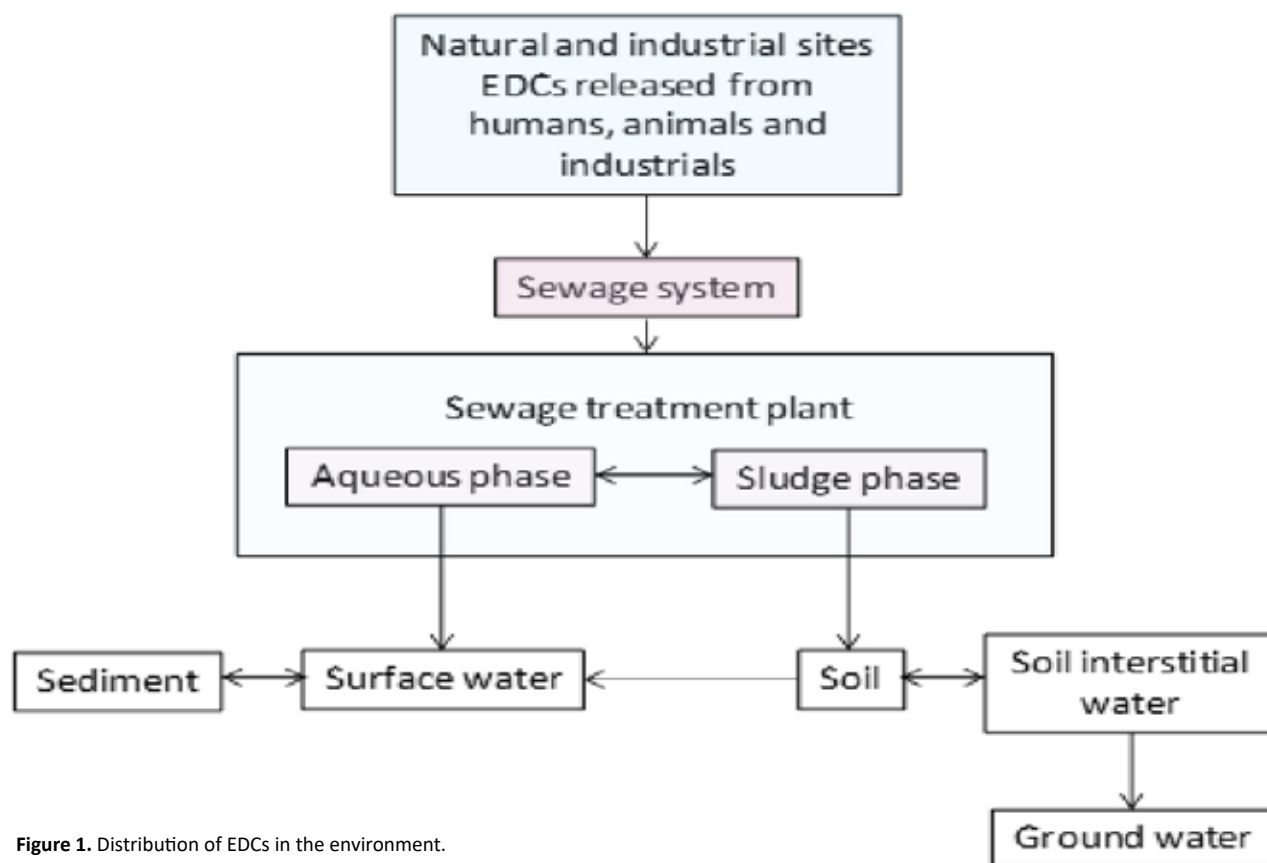


Figure 1. Distribution of EDCs in the environment.

Two classes of substances can cause endocrine disruption:

- Man-made substances which comprise: (i) synthetically-produced hormones, including oral contraceptives, such as ethynylestradiol (EE2), hormone replacement therapy and some animal feed additives, designed deliberately to interfere with and modulate the endocrine system; (ii) a variety of man-made chemicals, such triclosan (TCS) present in cleaning agents or bisphenol A (BPA) used in consumer goods and (iii) various by-products from industrial processes such as dioxins.

- Natural hormones which include estrogens such as estrone (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), and estriol (E3), progesterone and testosterone naturally found in the body of humans and animals, and phytoestrogens, such as isoflavonoides and coumestrol, present in some plants.

Endocrine systems regulate a multitude of developmental, metabolic, and reproductive processes including embryonic development, gonadal formation, sex differentiation, growth and digestion; therefore, endocrine disrupting compounds, may affect these processes by either binding to or blocking hormone receptors, thereby, triggering or preventing hormonal response.

## Bisphenol A

Bisphenol A (BPA) is an industrial organic compound of formula  $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$  with two phenol functional groups (Figure 2).

## Health effects

The production and use of BPA is a controversial issue all around the world. The National Toxicology Program Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (NTP) from the United States completed a review of BPA. Regarding BPA, the NTP expressed "some concern for effects on the brain, behavior, and prostate gland in fetuses, infants and children at current human exposures to bisphenol A". The Program also expressed "minimal concern for effects on the mammary gland and an earlier age for

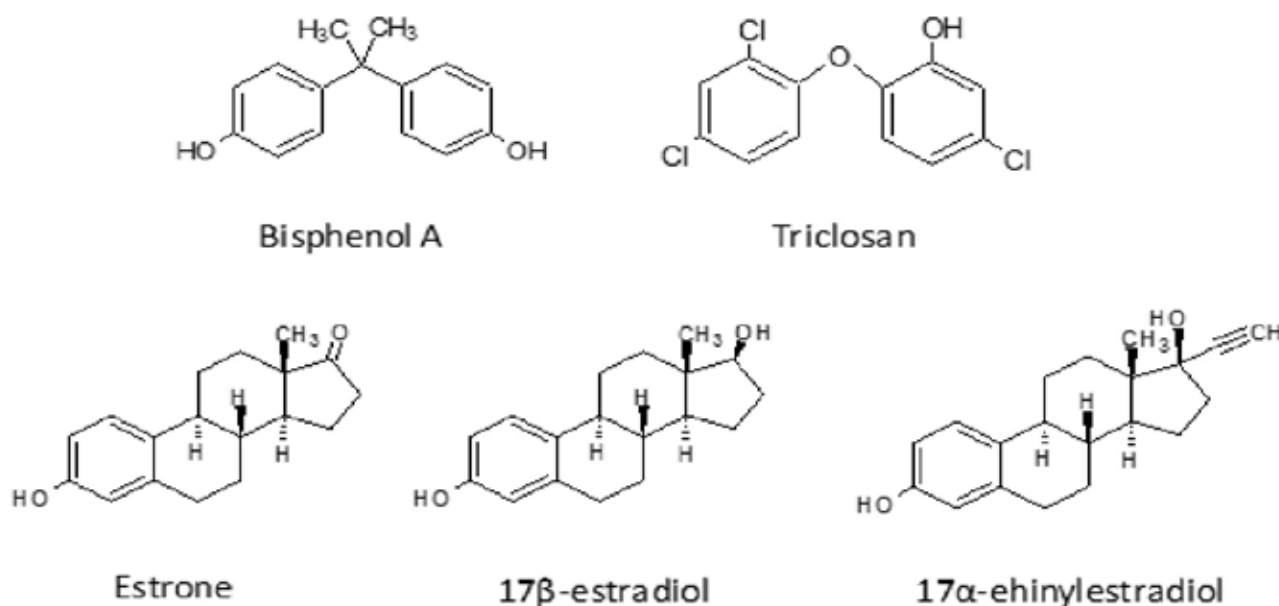
puberty for females in fetuses, infant, and children at current human exposures to bisphenol A" and "negligible concern" for other outcomes. However, the Program stated that "additional research is needed to fully assess the functional, long-term impacts of exposures to bisphenol A on the developing brain and behavior"<sup>2</sup>.

In March 2012, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) concluded that "the scientific evidence now does not suggest that the very low levels of human exposure to BPA through the diet are unsafe". However, the FDA recognizes potential uncertainties in the overall interpretation of these studies; therefore, in July 2012, the FDA banned the use of BPA in baby bottles and sippy cups.

Canada was the first country to take action on BPA, thanks to the Chemicals Management Plan, developed by Canadian Environmental Protection Act (CEPA). Although there is no general recommendation concerning BPA, the Canadian Government advised to reduce exposure of newborns and infants less than 18 months<sup>3</sup>. Consequently, the proposed ban applies only to baby bottles made of polycarbonate. All other containers made with other types of plastics can continue to be used safely.

Concerning the use of bisphenol A in Europe, in 2006 the European Food Safety Authority (EFSA) concluded that infants aged 3 and 6 months fed using polycarbonate infant feeding bottles have the highest exposure to BPA, though below the tolerable daily intake (TDI, 0.05 mg<sub>BPA</sub>/kg). Even if the infant has sufficient capacity to remove BPA at worst-case exposure, the EFSA pointed out that an infant's system to remove BPA is not as developed as that of an adult and it gradually reaches the adult capacity after 6 months. Consequently, the new EU regulation applied from May 1<sup>st</sup> 2011 prohibits the use of Bisphenol A in the manufacture or import of polycarbonate infant feeding bottles.

As a general conclusion, it can be established that even when it is not clearly demonstrated that BPA can have an effect on human beings, most countries around the world ban the use of BPA for the production of baby bottles or other household items that can be in close contact with infants.



**Figure 2.** Molecular structure of bisphenol A, triclosan, estrone, 17β-estradiol and 17α-ethinylestradiol

### Environmental risks

BPA emissions to the environment may be from several sources such as producing factories, installations that include BPA into plastic and leachates from plastic wastes and landfill sites. Variable ranges of BPA concentrations have been detected: 5–320 ng/L in river waters, 20–700 ng/L in sewage effluents, 2–208 ng/m<sup>3</sup> in air, 0.2–199 ng/g in dust and 0.1–384 ng/g in food-stuffs. Municipal wastewater treatment helps achieve removal efficiencies in the range of 90–99%, depending on the technical capabilities of sewage treatment systems<sup>4</sup>.

Based on reported EC<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub> values that range from 1.0 to 10 mg/L, BPA is classified as “moderately toxic” and “toxic” to aquatic biota by the European Commission and the United States Environmental Protection Agency (US EPA), respectively<sup>5</sup>. However, studies of BPA effects on wildlife indicate that the compound may be harmful even at environmentally relevant concentrations (12 μg/L) or lower<sup>6</sup>.

### Triclosan

Triclosan is a type of bisphenol that exhibits antimicrobial activity (Figure 2). It is a synthetic, non-ionic, broad-spectrum antimicrobial agent, possessing mostly antibacterial, but also antifungal and antiviral properties<sup>7</sup>. Triclosan is fairly insoluble in aqueous solutions except for alkaline pH, and it is readily soluble in most organic solvents.

It is used in many contemporary and professional health care products, such as hand soaps, hand washing solution, deodorants, etc<sup>7</sup>. It is also included into fabrics and plastics, as those in toys, toothbrush handles, cutting boards, pizza-cutter and mop handles, as well as surgical drapes and hospital over-the-bed table tops.

### Health effects

According to the FDA, there is no evidence that triclosan is hazardous to humans; there is no sufficient safety evidence to recommend changing consumer use of products that contain triclosan.

The Government of Canada completed its preliminary assessment of triclosan under the Canadian Environmental Protection Act and the Pest Controls Products Act. The review concludes that triclosan is not harmful to human health, but in significant amounts it may cause harm to the environment<sup>8</sup>.

The opinion of the European Commission, through the Scientific Committee on Consumer Products (SCPP), is that “taking into account the provided toxicological data, the continued use of triclosan as a preservative at the limit concentration of 0.3% in all cosmetic products is not safe for the consumer because of the magnitude of the aggregate exposure. However, its use at a maximum concentration of 0.3% in face products, toothpastes, hand soaps, body soaps/shower gels and deodorant sticks, is considered safe. However, the use of triclosan in other leave-on products (e.g. body lotions) and in mouthwash solutions is not considered safe for the consumer due to the higher level of exposure.”

### Environmental risks

The widespread use of triclosan results in the discharge of this compound to wastewater. Triclosan is transported through the domestic waste stream to wastewater treatment plants (WWTPs<sup>9</sup>). Municipal wastewater treatment helps achieve removal efficiencies in the range of 51–95%, depending on the technical capabilities of sewage treatment systems<sup>10,11</sup>. Both the incomplete removal of triclosan from wastewater treatment plants and its presence in biosolids spread as fertilizers lead to triclosan being distributed in soils and surface waters.

Mass balance studies have demonstrated that triclosan also exhibits significant persistence, partitioning and sequestration in biosolids (logK<sub>ow</sub>~4.2<sup>12</sup>), therefore 50±19% of the incoming triclosan, approximately, was observed to persist and become sequestered in biosolids in a typical WWTP comprising activated sludge treatment and anaerobic digestion<sup>13</sup>.

### Natural and synthetic hormone substances: estrone, 17β-estradiol and 17α-ethinylestradiol

Estrogens are a group of steroid compounds, named for their importance in the oestrus cycle, functioning as the primary female sex hormone. While estrogens are present in both men and women, they are usually presented at significant higher levels in women of reproductive age<sup>14</sup>. The natural estrogens, estrone (E1) and 17β-estradiol (E2), and the synthetic one, 17α-ethinylestradiol (EE2), Figure 2, are the estrogens most commonly found in wastewater<sup>15</sup>.

Estrone, C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>, also known as oestrone (3-hydroxy-1,3,5(10)-estretrien-17-one) is a C-18 natural steroid hormone. Estrone is one of the naturally occurring estrogens, the others being estradiol and estriol. Estrone is produced primarily from an-

drostenedione originating from the gonads or the adrenal cortex and from estradiol by 17-hydroxysteroid dehydrogenase. 17 $\beta$ -estradiol, C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>, also known as estradiol and oestradiol, (17 $\beta$ )-estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol, is another natural steroid hormone. Like other steroids, E2 is derived from cholesterol. 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>, is the major exogenous estrogen in humans. It is a bioactive estrogen used in several formulations of combined oral contraceptive pills. It was approved by the FDA in the United States on 1943 and the FDA withdrew approval on 2004.

All humans as well as animals can excrete hormone steroids from their bodies, which end up in the environment through sewage discharge and animal waste disposal. Based on daily excretion of estrogen, dilution factor and previous measurements, levels of estrogens in ng/l are expected to be present in aqueous environmental samples<sup>14</sup>. Those steroids have been detected in influents and effluents of sewage treatment plants and surface water; therefore, since the three estrogens are not completely removed by WWTPs they remain with fluctuating concentrations in effluent, and discharge of such effluent. This may be the main reason for the wide occurrence of estrogens in surface waters, ground waters and even in drinking waters<sup>16</sup>.

### White-rot fungi

White-rot fungi (WRF) belong to the class of basidiomycetes and certain ascomycetes, and they constitute the most important rotting fungi since they are the only microorganisms able to mineralize lignin producing carbon dioxide and water. The term "white-rot" has been traditionally used to describe forms of wood decay, leaving a light, white, rather fibrous residue completely different from the brown powder left by brown rot fungi. Generally, WRF are unable to use lignin as a sole carbon source but they degrade it in order to gain access to cellulose and hemicellulose. Within this group, *Phanerochaete chrysosporium* is the most extensively studied species, although other fungi such as *Bjerkandera adusta*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* are also well-known<sup>17</sup>.

Delignification is based on the WRF capacity to produce one or more extracellular lignin-modifying enzymes (LMEs) which, thanks to their lack of substrate specificity, are also capable of degrading a wide range of xenobiotics also at relatively low concentrations since they are not induced by either lignin or other related compounds<sup>18</sup>. The use of fungal cultures has been considered as an environmental tool to remove organic pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorinated and phenolic compounds,

dyes, pharmaceutical compounds, among others<sup>19</sup>.

### Lignin modifying enzymes

LMEs are oxidoreductases which catalyze the electron transfer from one substrate to another. LMEs act by generating free radicals that randomly attack the lignin molecule, breaking covalent bonds and releasing a range of phenolic compounds.

There are two main types of LMEs: peroxidases and laccases (phenol oxidases). The main LMEs are lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), versatile peroxidase (VP) and laccases (Lac). In addition, these fungi secrete mediators of high molecular weight increasing the range of potentially biodegradable compounds. White-rot fungi start LMEs production during their secondary metabolism, since lignin oxidation provides no net energy to fungi<sup>20</sup>. These enzymes are responsible for generating highly reactive and non-specific free radicals<sup>21</sup> that make them attractive for the development of advanced oxidation processes, where these enzymes may oxidize and degrade highly recalcitrant compounds. The main lignin-modifying enzymes are described below.

### Laccase (Lac, E.C.1.10.3.2)

The enzyme laccase is a multi-copper oxidase that catalyzes one-electron oxidations by transferring one electron from four substrate molecules to one molecule of molecular oxygen which is reduced to water. Laccase shows low substrate specificity and can react with diphenols, aryl diamines, aminophenols. The redox potential of laccases is in the range between 780-800 mV. However, in presence of a mediator, laccase is able to oxidize also non-phenolic molecules. It has been isolated from cultures of *Aspergillus* and thermophilic fungi such as *Myceliophora thermophila*, *Chaetomium thermophilum*, among others<sup>20</sup>.

### Lignin peroxidase (LiP, E.C.1.11.1.14)

It was the first ligninolytic enzyme isolated in 1980's decade from the fungus *Phanerochaete chrysosporium*<sup>22</sup>. It is a glycoprotein with molecular mass between 38 and 47 kDa with a distinctive feature of an unusually low pH optimum near 3. It is able to catalyze the oxidation of phenolic and aromatic compounds with a similar structure to lignin. LiP shows a classical peroxidase mechanism: it can react with phenolic aromatic substrates forming phenoxy radicals, but it is unique in its ability to oxidize substrates of high redox potential (up to 1.4 V)<sup>20</sup>.

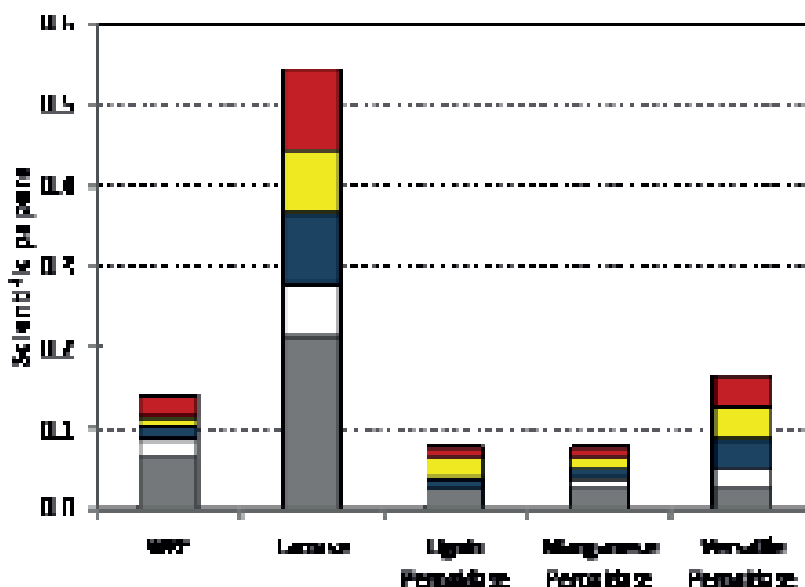


Figure 3. Impact of the in vivo and in vitro WRF processes in the elimination of EDCs. BPA (grey), TCS (white), E1 (blue), E2 (yellow) and EE2 (red).



EDC	Fungus	Concentration	Removal (%)	EAR* (%)	Reference
BPA	<i>Stropharia coronilla</i>	25 mg/L	—	100	28
	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	25 mg/L	—	100	
	GIM <i>Irpex lacteus</i>	100 mg/L	50 (3 d)	60	25
	<i>Irpex lacteus</i>	10 mg/L	>90 (14 d)	98 (14 d)	26
	<i>Bjerkandera adusta</i>	10 mg/L	75 (14 d)	90 (14 d)	
	<i>Phanerochaete magnoliae</i>	10 mg/L	>90 (14 d)	85 (14 d)	27
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	10 mg/L	>90 (14 d)	100 (14 d)	
	<i>Trametes versicolor</i>	10 mg/L	>90 (14 d)	100 (14 d)	
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	10 mg/L	>90 (14 d)	85 (14 d)	
	<i>Dichomitus squalens</i>	10 mg/L	>90 (14 d)	86 (14 d)	
	<i>Stereum hirsutum</i>	200 mg/L	100 (14 d)	n.a.	
	<i>Heterobasidium</i>	200 mg/L	100 (14 d)	n.a.	29
<i>Iresularia</i>					
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	400 µM	80 (12 d)	n.a.	
TCS	<i>Irpex lacteus</i>	10 mg/L	99 (14 d)	98 (14 d)	26
	<i>Bjerkandera adusta</i>	10 mg/L	0 (14 d)	22 (14 d)	
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	10 mg/L	91 (14 d)	98 (14 d)	

n.a.: not available

\* EAR: estrogenic activity reduction

Table 1. Elimination of EDCs and reduction of estrogenicity by WRF

LME	EDC	Fungus	Concentration	Removal (%)	EAR* (%)	References
Lac	BPA	<i>Ganoderma lucidum</i>	2-20 mg/L	99-88.5	n.a.	37
		<i>Trametes versicolor</i>	1000 µM	100 (90 min)	n.a.	38
			50 µM	100 (20 min)	n.a.	39
			220 µM	50-70 (30-60 min)	40-60 (1-6 h)	40
		<i>Trametes villosa</i>	2.2 µM	100 (3 h)	n.a.	41-43
		Strain I-4 isolated from Japanese soil	5 mM	95-100 (1-3 h)	100 (24 h)	44, 45
		<i>Coriolopsis polyzona</i>	100 mg/L	45 (250 min)	n.a.	46
			5 mg/L	40-100 (1-4 h)	35-95 (1-4 h)	47
		<i>Coriolus versicolor</i>	100 µM	100 (1 h)	n.a.	48
			3 µmol/g <sub>ma</sub>	80-100 (5 d)	n.a.	49
		<i>Pycnoporus coccineus</i>	3 µmol/g <sub>ma</sub>	15 (5 h)		50
		<i>Trametes</i> sp.	200 µM	95-100 (1-3 h)	n.a.	51
			3 µmol/g <sub>ma</sub>	90-100 (2-8 h)	n.a.	50
TCS	<i>Carrina unicolor</i>	50 µM	60 (120 min)	n.a.	52	
		5 mg/L	60 (6 h)	n.a.	53	

n.a.: not available

\* EAR: estrogenic activity reduction

Table 2. Elimination of EDCs and reduction of estrogenicity by LMEs

### Manganese peroxidase (MnP, E.C.1.11.1.13)

Manganese peroxidase is an extracellular enzyme which is considered the most widespread ligninolytic peroxidase produced by almost all white-rot basidiomycetes and by various litter-decomposing fungi<sup>20</sup>. MnP is a glycoprotein with molecular weights between 32 and 62.5 kDa. This enzyme has a similar catalytic cycle to other peroxidases involving a two-electron oxidation; however, MnP is able to oxidize  $Mn^{2+}$ , resulting in the formation of diffusible oxidants ( $Mn^{3+}$ ) capable of penetrating the cell wall matrix and oxidizing mainly phenolic substrates<sup>23</sup>.

The catalytic cycle is initiated by binding of  $H_2O_2$  to the native (ferric) enzyme and formation of an iron- $H_2O_2$  complex. Subsequent cleavage of the  $H_2O_2$  oxygen-oxygen bond requires a two-electron transfer from the heme resulting in formation of MnP-I ( $Fe^{4+}$ ). Afterwards, the O-O bond is heterolytically cleaved and a  $H_2O$  molecule released. Subsequent reduction proceeds through MnP-II ( $Fe^{4+}$ ).  $Mn^{2+}$  ion acts as one electron-donor for this porphyrin intermediate and is oxidized to  $Mn^{3+}$ . The reduction of MnP-II proceeds in a similar way and another  $Mn^{3+}$  is formed from  $Mn^{2+}$ , thereby leading to generation of native enzyme and release of the second water molecule. MnP is sensitive to high concentrations of  $H_2O_2$  that cause reversible inactivation of the enzyme by forming MnP-III<sup>23</sup>, a catalytically inactive oxidation state but can be rescued by  $Mn^{3+}$  ions. This species can form complexes with organic acids, such as malonic or oxalic acid, secreted by the fungus in significant amounts that attack organic molecules non-specifically at location remote from the enzyme active site. These chelators could also accomplish other physiological functions; they enhance the dissociation of  $Mn^{2+}$  from the enzyme improving its activity, allow the fungus to control pH, sequester  $Ca^{2+}$  ions to increase the pore size of the plant cell wall and facilitate the penetration of the enzyme or react with  $O_2$  to form  $H_2O_2$  useful for the enzyme activity<sup>23</sup>.

### Versatile peroxidase (VP, E.C.1.11.1.16)

The enzyme VP is a peroxidase which combines the substrate specificity characteristics of the three other fungal peroxidases (MnP, LiP and *Coprinopsis cinerea* peroxidase). In this way, it is able to oxidize a variety of high and low redox potential substrates including  $Mn^{2+}$ , phenolic and non-phenolic lignin dimers,  $\alpha$ -keto- $\gamma$ -thiomethyl-butyric acid (KTBA), veratryl alcohol- dimethoxybenzenes, different types of dyes (Reactive Black 5), substituted phenols and hydroquinones. VP is only produced by fungi from the genera *Pleurotus*, *Bjerkandera* and *Lepista*. The VP catalytic cycle includes two-electron oxidation of the resting peroxidase (VP, containing  $Fe^{3+}$ ) by hydrogen peroxide to yield compound I (C-IA, containing  $Fe^{4+}$ -oxo and porphyrin cation radical), whose reduction in two one-electron reactions, producing  $Mn^{3+}$ , results in the intermediate compound II (C-IIA, containing  $Fe^{4+}$ -oxo after porphyrin reduction) and then the resting form of the enzyme. Compounds C-IB and C-IIB are involved in the oxidation of veratryl alcohol and other high redox potential aromatic compounds<sup>24</sup>.

### Removal of EDCs by white rot fungi (WRF) and their lignin modifying enzymes (LMEs)

Although conventional biological treatment processes have been reported effective at reducing levels of some EDCs in wastewater and sewage, the low levels of these contaminants in wastewater effluents are still a major concern for the receiving environment and downstream users because EDCs exert physiological effects at very low concentrations. Therefore, post-treatments methods for the removal of these compounds are being investigated: (i) physical methods such as adsorption or membrane separation; (ii) chemical treatments, such as those based on oxidative catalysis, chlorination, ozonation and other advanced oxidation processes (AOPs). In general, these processes have high degradation rate but they have low selectivity and high costs. In addition, AOPs can be a

cause of concern itself since they may render harmful by-products or transformation products which can have similar or increased estrogenicity of that of the parent compound.

An environmentally friendly alternative for the elimination of EDCs may be the use of microorganisms. Among the different possible microorganisms, white rot fungi appear to be a good choice since they have been reported to degrade a wide range of organic pollutants<sup>19</sup>. Several authors have demonstrated the ability of different WRF not only to eliminate EDCs but also to reduce their estrogenic activity (Table 1).

WRF were demonstrated to easily eliminate EDCs, reaching removal yields higher than 90%<sup>25,26</sup> or even 100%<sup>26,27</sup> when the initial concentration was within the order of mg/L. As a consequence, WRF were able to reduce the estrogenic activity up to values of 100%<sup>28</sup>. However, in the case of estrogenic compounds such as E1, E2 and EE2, the estrogenic activity reduction was lower (15-94%)<sup>26</sup>.

The main drawback of using white rot fungi for the degradation of organic pollutants is the necessity of working in aseptic conditions. Moreover, as shown in Table 1, the time required to eliminate 90% of the initial EDCs amount is between 10 and 14 days. As a consequence, the development of this alternative is costly and problematical.

The capability of this fungal class to remove pollutants usually is related to the production and secretion of lignin modifying enzymes. Several works have demonstrated that the use of LMEs is a good environmental tool for the elimination of organic pollutants EDCs (Table 2). Among the different enzymes, laccase is the most documented oxidative enzyme considered for the elimination of EDCs (Figure 3).

The main advantage related to the use of this enzyme over other oxidases and peroxidases is its availability (e.g. DeniLite®, the commercial laccase preparation from Novozymes, Denmark) due to the scale-up of its production. However, one of its major disadvantages is that the redox potential of laccase is low (0.5 - 0.8 V) when compared with other ligninolytic enzymes such as peroxidases, 1.45-1.51 V<sup>20</sup> and it typically requires chemical mediators acting as the real oxidants, participating in the catalytic cycle of the enzyme<sup>33</sup>. Most of these mediators are environmentally unsafe (HBT, for example) and may have an important economical impact on the treatment. As a general approach, it can be established that removal yield values reached by using peroxidases are higher, between 90% and 100%<sup>34</sup> than those observed when using laccases for the elimination of EDCs<sup>35</sup>.

From an economical point of view, an evaluation of the use of LMEs demonstrated that processes based on free peroxidase is economically competitive compared to photolysis, ozonolysis and Fenton processes<sup>36</sup>.

## CONCLUSIONS

Existing traditional WWTPs are not able to eliminate EDCs completely, therefore the search of new technologies suitable for the treatment of wastewater containing them is a challenge to be addressed. The widespread technologies used for the elimination of EDCs are AOPs such as photocatalysis, photodegradation, sonolysis, ozonolysis, among others which have been demonstrated to get high elimination yields. However, these processes present low selectivity and high costs. Moreover, AOPs can be a cause of concern itself since they may render harmful by-products or transformation products which can have similar or increased estrogenicity of that of the parent compound.

A biological alternative may be the use of WRF and/or their LMEs. From an operational point of view, the use of LMEs in *in vitro* systems, compared to the use of WRF in *in vivo* systems, is easier, cheaper and faster. Among the LMEs,



laccase is the most extensively studied enzyme for the degradation of BPA, TCS, E1, E2 and EE2. Nevertheless, peroxidases have higher redox potential and consequently they provide better results of EDC removal (in terms of yield and degradation rate).

## Acknowledgements

R. Taboada-Puig would like to express his gratitude to the Yachay Tech University and to the Spanish Ministry of Science and Innovation for their financial supports (BES-2008-006977) for his financial support. This work was financially supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CTQ2013-44762-R and CTQ2016-79461-R). The authors from the USC belong to the Galician Competitive Research Group GRC 2013-032 (program co-funded by FEDER) and to the strategic group CRETUS (AGRUP2015/02).

## REFERENCES

- USEPA, Special report on endocrine disruption. An effects assessment and analysis. In U.S. EPA: Washington, DC, 1997.
- NTP-CERHR, Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. 2008.
- C.G., Canada Gazette Part II. 2010, 144, (21).
- Drewes, J. E.; Hemming, J.; Ladenburger, S. J.; Schauer, J.; Sonzogni, W., An assessment of endocrine disrupting activity changes during wastewater treatment through the use of bioassays and chemical measurements. *Water Environment Research* 2005, 77, (1), 12-23.
- Alexander, H. C.; Dill, D. C.; Smith, L. W.; Guiney, P. D.; Dorn, P., Bisphenol A: acute aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1988, 7, (1), 19-26.
- Flint, S.; Markle, T.; Thompson, S.; Wallace, E., Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *Journal of Environmental Management* 2012, 104, 19-34.
- Jones, R. D.; Jampani, H. B.; Newman, J. L.; Lee, A. S., Triclosan: A review of effectiveness and safety in health care settings. *American Journal of Infection Control* 2000, 28, (2), 184-196.
- C.G., Canada Gazette Part I. 2012, 146, (13).
- Bedoux, G.; Roig, B.; Thomas, O.; Dupont, V.; Le Bot, B., Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* 2012, 19, (4), 1044-1065.
- Yu, C.-P.; Chu, K.-H., Occurrence of pharmaceuticals and personal care products along the West Prong Little Pigeon River in east Tennessee, USA. *Chemosphere* 2009, 75, (10), 1281-1286.
- Bester, K., Fate of triclosan and triclosan-methyl in sewage treatment plants and surface waters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2005, 49, (1), 9-17.
- Lopez-Avila, V.; Hites, R. A., Organic compounds in industrial wastewater. Their transport into sediments. *Environmental Science & Technology* 1980, 14, (11), 1382-1390.
- Heidler, J.; Halden, R. U., Mass balance assessment of triclosan removal during conventional sewage treatment. *Chemosphere* 2007, 66, (2), 362-369.
- Johnson, A. C.; Belfroid, A.; Di Corcia, A., Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Science of the Total Environment* 2000, 256, (2-3), 163-173.
- Racz, L.; Goel, R. K., Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. *Journal of Environmental Monitoring* 2010, 12, (1), 58-70.
- Liu, Z.-h.; Kanjo, Y.; Mizutani, S., Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment - physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *Science of the Total Environment* 2009, 407, (2), 731-748.
- Schwarze, F.; Baum, S.; Fink, S., Dual modes of degradation by *Fistulina hepatica* in xylem cell walls of *Quercus robur*. *Mycological Research* 2000, 104, 846-852.
- Mester, T.; Tien, M., Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2000, 46, (1), 51-59.
- Kulikova, N. A.; Klein, O. I.; Stepanova, E. V.; Koroleva, O. V., Use of Basidiomycetes in Industrial Waste Processing and Utilization Technologies: Fundamental and Applied Aspects (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 2011, 47, (6), 565-579.
- Wesenberg, D.; Kyriakides, I.; Agathos, S. N., White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 2003, 22, (1-2), 161-187.
- Kersten, P.; Cullen, D., Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genetics and Biology* 2007, 44, (2), 77-87.
- Tien, M.; Kirk, T. K., Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Method Enzymol* 1988, 161, 238-249.
- Wong, D. W. S., Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2009, 157, (2), 174-209.
- Perez-Boada, M.; Ruiz-Duenas, F. J.; Pogni, R.; Basosi, R.; Choinowski, T.; Martinez, M. J.; Piontek, K.; Martinez, A. T., Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: Site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *Journal of Molecular Biology* 2005, 354, (2), 385-402.
- Kum, H.; Kim, M. K.; Choi, H. T., Degradation of endocrine disrupting chemicals by genetic transformants in *Irpex lacteus* with an inducible laccase gene of *Phlebia tremellosa*. *Biodegradation* 2009, 20, (5), 673-678.
- Cajthaml, T.; Kresinova, Z.; Svobodova, K.; Moder, M., Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere* 2009, 75, (6), 745-750.
- Lee, S. M.; Koo, B. W.; Lee, S. S.; Kim, M. K.; Choi, D. H.; Hong, E. J.; Jeung, E. B.; Choi, I. G., Biodegradation of dibutylphthalate by white rot fungi and evaluation on its estrogenic activity. *Enzyme and Microbial Technology* 2004, 35, (5), 417-423.
- Kabiersch, G.; Rajasarkka, J.; Ullrich, R.; Tuomela, M.; Hofrichter, M.; Virta, M.; Hatakka, A.; Steffen, K., Fate of bisphenol A during treatment with the litter-decomposing fungi *Stropharia rugosoannulata* and *Stropharia coronilla*. *Chemosphere* 2011, 83, (3), 226-232.
- Hirano, T.; Honda, Y.; Watanabe, T.; Kuwahara, M., Degradation of bisphenol a by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 2000, 64, (9), 1958-1962.
- Hundt, K.; Martin, D.; Hammer, E.; Jonas, U.; Kindermann, M. K.; Schauer, F., Transformation of triclosan by *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology* 2000, 66, (9), 4157-4160.
- Tamagawa, Y.; Hirai, H.; Kawai, S.; Nishida, T., Removal of estrogenic activity of endocrine-disrupting genistein by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Fems Microbiology Letters* 2005, 244, 93-98.
- Blanquez, P.; Guieysse, B., Biodegradation of estrogenic compounds by white rot fungi. *J. Biotechnol.* 2007, 131, (2), S244-S245.
- Lloret, L.; Eibes, G.; Lu-Chau, T. A.; Moreira, M. T.; Feijoo, G.; Lema, J. M., Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. *Biochemical Engineering Journal* 2010, 51, (3), 124-131.
- Taboada-Puig, R.; Eibes, G.; Lloret, L.; Lu-Chau, T. A.; Feijoo, G.; Moreira, M. T.; Lema, J. M., Fostering the action of versatile peroxidase as a highly efficient biocatalyst for the removal of endocrine disrupting compounds. *New Biotechnology* 2016, 33, (1), 187-195.
- Lloret, L.; Eibes, G.; Feijoo, G.; Moreira, M. T.; Lema, J. M., Application of response surface methodology to study the removal of estrogens in a laccase-mediated continuous membrane reactor. *Biocatalysis and Biotransformation* 2013, 31, (4), 197-207.

36. Lopez, C.; Teresa Moreira, M.; Feijoo, G.; Manuel Lema, J., Economic comparison of enzymatic reactors and advanced oxidation processes applied to the degradation of phenol as a model compound. *Biocatalysis and Biotransformation* 2011, 29, (6), 344-353.
37. Liao, C.-S.; Yuan, S.-Y.; Hung, B.-H.; Chang, B.-V., Removal of organic toxic chemicals using the spent mushroom compost of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Environmental Monitoring* 2012, 14, (7), 1983-1988.
38. Nicolucci, C.; Rossi, S.; Menale, C.; Godjevargova, T.; Ivanov, Y.; Bianco, M.; Mita, L.; Bencivenga, U.; Mita, D. G.; Diano, N., Biodegradation of bisphenols with immobilized laccase or tyrosinase on polyacrylonitrile beads. *Biodegradation* 2011, 22, (3), 673-683.
39. Georgieva, S.; Godjevargova, T.; Mita, D. G.; Diano, N.; Menale, C.; Nicolucci, C.; Carratelli, C. R.; Mita, L.; Golovinsky, E., Non-isothermal bioremediation of waters polluted by phenol and some of its derivatives by laccase covalently immobilized on polypropylene membranes. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 2010, 66, (1-2), 210-218.
40. Tsutsumi, Y.; Haneda, T.; Nishida, T., Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere* 2001, 42, (3), 271-276.
41. Fukuda, T.; Uchida, H.; Suzuki, M.; Miyamoto, H.; Morinaga, H.; Nawata, H.; Uwajima, T., Transformation products of bisphenol A by a recombinant *Trametes vilosa* laccase and their estrogenic activity. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2004, 79, (11), 1212-1218.
42. Fukuda, T.; Uchida, H.; Takashima, Y.; Uwajima, T.; Kawabata, T.; Suzuki, M., Degradation of bisphenol a by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001, 284, (3), 704-706.
43. Uchida, H.; Fukuda, T.; Miyamoto, H.; Kawabata, T.; Suzuki, M.; Uwajima, T., Polymerization of Bisphenol A by Purified Laccase from *Trametes villosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001, 287, (2), 355-358.
44. Saito, T.; Hong, P.; Kato, K.; Okazaki, M.; Inagaki, H.; Maeda, S.; Yokogawa, Y., Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family Chaetomiaceae) isolated from soil. *Enzyme and Microbial Technology* 2003, 33, (4), 520-526.
45. Saito, T.; Kato, K.; Yokogawa, Y.; Nishida, M.; Yamashita, N., Detoxification of bisphenol A and nonylphenol by purified extracellular laccase from a fungus isolated from soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2004, 98, (1), 64-66.
46. Cabana, H.; Alexandre, C.; Agathos, S. N.; Jones, J. P., Immobilization of laccase from the white rot fungus *Corioliopsis polyzona* and use of the immobilized biocatalyst for the continuous elimination of endocrine disrupting chemicals. *Bioresource Technology* 2009, 100, (14), 3447-3458.
47. Cabana, H.; Jiwan, J. L. H.; Rozenberg, R.; Elisashvili, V.; Peninckx, M.; Agathos, S. N.; Jones, J. P., Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Corioliopsis polyzona*. *Chemosphere* 2007, 67, (4), 770-778.
48. Okazaki, S.-y.; Michizoe, J.; Goto, M.; Furusaki, S.; Wariishi, H.; Tanaka, H., Oxidation of bisphenol A catalyzed by laccase hosted in reversed micelles in organic media. *Enzyme and Microbial Technology* 2002, 31, (3), 227-232.
49. Tanaka, T.; Yamada, K.; Tonosaki, T.; Konishi, T.; Goto, H.; Taniguchi, M., Enzymatic degradation of alkylphenols, bisphenol A, synthetic estrogen and phthalic ester. *Water Sci Technol* 2000, 42, (7-8), 89-95.
50. Tanaka, T.; Tonosaki, T.; Nose, M.; Tomidokoro, N.; Kadomura, N.; Fujii, T.; Taniguchi, M., Treatment of model soils contaminated with phenolic endocrine-disrupting chemicals with laccase from *Trametes sp* in a rotating reactor. *J Biosci Bioeng* 2001, 92, (4), 312-316.
51. Michizoe, Y.; Ichinose, H.; Kamiya, N.; Maruyama, T.; Goto, M., Biodegradation of phenolic environmental pollutants by a surfactant-laccase complex in organic media. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2005, 99, (6), 642-647.
52. Songulashvili, G.; Jimenez-Tobon, G. A.; Jaspers, C.; Peninckx, M. J., Immobilized laccase of *Cerrena unicolor* for elimination of endocrine disruptor micropollutants. *Fungal biology* 2012, 116, (8), 883-9.
53. Cabana, H.; Ahamed, A.; Leduc, R., Conjugation of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor* to chitosan and its utilization for the elimination of triclosan. *Bioresource Technology* 2011, 102, (2), 1656-1662.
54. Inoue, Y.; Hata, T.; Kawai, S.; Okamura, H.; Nishida, T., Elimination and detoxification of triclosan by manganese peroxidase from white rot fungus. *Journal of Hazardous Materials* 2010, 180, (1-3), 764-767.
55. Murugesan, K.; Chang, Y.-Y.; Kim, Y.-M.; Jeon, J.-R.; Kim, E.-J.; Chang, Y.-S., Enhanced transformation of triclosan by laccase in the presence of redox mediators. *Water Research* 2010, 44, (1), 298-308.
56. Tanaka, T.; Tamura, T.; Ishizaki, Y.; Kawasaki, A.; Kawase, T.; Teraguchi, M.; Taniguchi, M., Enzymatic treatment of estrogens and estrogen glucuronide. *Journal of Environmental Sciences-China* 2009, 21, (6), 731-735.
57. Auriol, M.; Filali-Meknassi, Y.; Tyagi, R. D.; Adams, C. D., Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater. *Water Research* 2007, 41, 3281-3288.
58. Auriol, M.; Filali-Meknassi, Y.; Adams, C. D.; Tyagi, R. D.; Noguero, T. N.; Pina, B., Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: Efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 2008, 70, (3), 445-452.
59. Wang, J.; Majima, N.; Hirai, H.; Kawagishi, H., Effective Removal of Endocrine-Disrupting Compounds by Lignin Peroxidase from the White-Rot Fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Current Microbiology* 2012, 64, (3), 300-303.
60. Kimura, M.; Michizoe, J.; Okazaki, S.; Furusaki, S.; Goto, M.; Tanaka, H.; Wariishi, H., Activation of lignin peroxidase in organic media by reversed micelles. *Biotechnology and Bioengineering* 2004, 88, (4), 495-501.
61. Mao, L.; Huang, Q.; Lu, J.; Gao, S., Ligninase-Mediated Removal of Natural and Synthetic Estrogens from Water: I. Reaction Behaviors. *Environmental Science & Technology* 2009, 43, (2), 374-379.
62. Tamagawa, Y.; Yamaki, R.; Hirai, H.; Kawai, S.; Nishida, T., Removal of estrogenic activity of natural steroidal hormone estrone by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Chemosphere* 2006, 65, (1), 97-101.
63. Suzuki, K.; Hirai, H.; Murata, H.; Nishida, T., Removal of estrogenic activities of 17 beta-estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Res* 2003, 37, (8), 1972-1975.
64. Eibes, G.; Debernardi, G.; Feijoo Costa, G.; Moreira Vilar, M. T.; Lema Rodicio, J. M., Oxidation of pharmaceutically active compounds by a ligninolytic fungal peroxidase. *Biodegradation* 2010.

Recibido: enero 2017

Aprobado: febrero 2017







## NEWS AND VIEWS

**Espeletia pycnophylla subsp. angelensis, el ángel del norte.**

Espeletia pycnophylla subsp. angelensis, the angel of the north.

Rodríguez Rebeca, Tigmasa Nahomy, García Katherine, Pazmiño Rubén y Caamaño Renzo<sup>1</sup>

DOI. 10.21931/RB/2017.02.01.10

## RESUMEN

*Espeletia pycnophylla subsp. angelensis* es una subespecie del género *Espeletia*, comúnmente conocido como frailejón, nativo de Ecuador y Colombia. Uno de sus asentamientos primarios es la Reserva Ecológica El Ángel. Al ser miembro de los frailejones domina el páramo de la reserva, y ayuda a cumplir su función esencial: captar y distribuir el agua hacia tierras bajas. Además, posee ventajas adaptativas que le permiten soportar los climas extremos del páramo, así como una alta especificidad en la altura en donde crece. Los estudios realizados sobre esta especie muestran que los frailejones son un ecosistema en sí mismos. En especial, recientes investigaciones los identifican como hogar de varias especies de artrópodos. *Espeletia pycnophylla subsp. angelensis* sufre varias amenazas relacionadas con alteraciones en el clima de su hábitat, y es de vital importancia un plan de acción para protegerlo, así como también a su hábitat.

Palabras Clave: Frailejón, El Ángel, páramo, adaptabilidad, ecosistema.

## ABSTRACT

*Espeletia pycnophylla subsp. angelensis* is a subspecies of the genus *Espeletia*, commonly known as "frailejón" native of Ecuador and Colombia. One of its primary settlements is El Ángel Ecological Reserve. Because it is a member of the "frailejones", it dominates the reserve paramo, and helps to fulfill its essential function: to capture and distribute the water to the lowlands. It also has adaptive advantages that allow it to withstand the extreme climates of the paramo, as well as a high specificity in the height where it grows. Studies of this species show that frailejones are an ecosystem in themselves. In particular, recent research identifies them as home to several species of arthropods. *Espeletia pycnophylla subsp. Angelensis* suffers several threats related to alterations in the climate of its habitat, and an action plan to protect it, as well as its habitat, is of vital importance.

Keywords: Frailejón, El Ángel, páramo, adaptability, ecosystem.

**Introducción**

La especie *Espeletia pycnophylla*, conocida comúnmente como frailejón, cubre los páramos andinos y representa una de los mayores exponentes de este tipo de ecosistemas. Estas especies de plantas sirven como indicadoras para determinar el ecosistema Rosetal caulescente y herbazal montano alto y montano alto superior de páramo, se usa esta especie por su gran abundancia en este tipo de ecosistemas. La única subespecie endémica de frailejones del Ecuador<sup>1</sup> es *E. pycnophylla subsp. angelensis*, aunque ha sido también registrada en el sur de Colombia<sup>2</sup>. La Reserva Ecológica El Ángel (REEA) está conformada en un 90% de su área por un ecosistema característicos de paramo. *E. pycnophylla* es abundante en este bioma, por lo que este ecosistema es comúnmente conocido como páramo de frailejones<sup>3,4</sup>. Este artículo de revisión presenta información relacionada a la fisiología, morfología, hábitat, y la función de *E. pycnophylla* en el ecosistema, además de las amenazas que sufre esta especie en la REEA.

**Hábitat de *Espeletia pycnophylla*: Reserva Ecológica El Ángel**

En el Ecuador, *E. pycnophylla* habita principalmente en la REEA. Esta reserva está ubicada en la provincia del Carchi, con una extensión de 1659,1 hectáreas. El área se extiende desde los 3200 a 4200 msnm, por lo que el territorio en general es páramo húmedo. La tem-

peratura varía entre 4 y 10 °C. La REEA es un recurso hídrico para la provincia del Carchi. Adicionalmente, las precipitaciones pluviales anuales abarcan un rango entre 2000 y 3000 mm<sup>5</sup>.

La flora presente en la reserva incluye: Frailejón (*Espeletia spp.*), Huesito de páramo (*Arcytophyllum nitiudum*), Romero de Páramo (*Diplostephium spp.*), Polylepis (*Polylepis spp.*), entre otras<sup>6</sup>. La presencia de *E. pycnophylla subsp. angelensis* (Fig.1) es uno de los motivos por el cual la REEA fue declarada área protegida. Además, el hecho de que esta área está constituida en su mayoría por páramo, hace indispensable la preservación de la REEA.

El páramo es un ecosistema natural que se encuentra entre el límite continuo del bosque y el de las nieves perpetuas, en la alta montaña tropical húmeda.<sup>10</sup> El páramo es un factor importante para la biodiversidad existente en el Ecuador<sup>8</sup>. El país posee el mayor número de páramos respecto a su extensión total, cubriendo alrededor de un 6% del territorio<sup>9</sup>. El cuidado de los páramos es importante puesto que sus suelos cumplen la función de captar y distribuir el agua hacia tierras bajas. Además, la frialdad característica del páramo ralentiza la descomposición de materia orgánica, funcionando como una esponja de agua del ecosistema. Finalmente, esta materia orgánica hace que el suelo del páramo sea un sumidero de carbono que contribuye a la reducción de la acumulación de gases tóxicos en la atmósfera y de los efectos del cambio climático<sup>11</sup>.

<sup>1</sup> Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay Tech, Urququi, Ecuador.

Correspondencia: renzo.caamano@yachaytech.edu.ec



Figura 2. *Espeletia pycnophylla* ssp. *angelensis* Cuatrec. (Asteraceae)

### ***Espeletia pycnophylla* subsp. *angelensis*: descripción fisiológica y morfológica**

*E. pycnophylla* subsp. *angelensis* es una roseta caulescente, perenne, de hojas densamente pubescentes, obovadas, oblongas, sésiles e de inflorescencias desnudas. *E. pycnophylla* es la única especie perteneciente al género *Espeletia* (Fig. 2), registrada en los páramos colombianos y ecuatorianos, además de ser considerada el último evento de especialización de la subtribu *Espeletiinae*<sup>12</sup>.

La subtribu *Espeletiinae* contiene 142 especies agrupadas en ocho géneros, encontrándose entre ellos el género *Espeletia* que agrupa 62 especies que se distribuyen desde la Sierra Nevada de Venezuela, El Macizo, el Nudo de Pastos y la Cordillera Central y Oriental de Colombia y el norte de Ecuador, además de lugares apartados como<sup>13</sup>.

El grupo de los *Espeletias* posee absorción eficiente de nutrientes para estar presentes en zonas de bajas temperaturas. Por eso es que la morfología de la planta debe ser eficiente en el manejo de su presupuesto de agua, nutrientes y carbono<sup>14</sup>.

Las plantas del género *Espeletia* están compuestas por un 73.5 % de necromasa (hojas y estructuras muertas de reproducción). Únicamente el 26% de la planta está compuesta por biomasa, dividiéndose entre raíces y ramas (Fig. 3). Esta parte de la planta son importantes para su supervivencia. La raíz subdesarrollada indica que la planta no explota el suelo para obtener nutrientes, debido a que obtiene los nutrientes de la lluvia. La planta produce todo el año hojas denominadas “siempre verdes”, que son hojas jóvenes y finas, dispuestas verticalmente y en forma de roseta dando como resultado una fotosíntesis eficiente y canalización de nutrientes hacia las raíces<sup>14</sup>.

La capa de hojas muertas es una característica común de esta especie y de la flora de los Andes, que se forma de manera gradual y es indispensable para la supervivencia de las estas plantas. Esta capa es considerada una capa aislante para que el agua almacenada en la médula no se congele, funcionando también como una reserva de nutrientes y centro de gravedad aumentando su estabilidad e impidiendo que la planta se vuelque. Inclusive, el volcamiento es una de las principales causas de muerte<sup>15,16,17</sup>.

En el caso de *E. pycnophylla* subsp. *angelensis* existe un óptimo de tolerancia altitudinal (nivel intermedio del factor), donde la abundancia de los individuos es máxima y disminuye cuasi-simétricamente hacia ambos lados del gradiente (Fig. 4). A 3500 msnm se establece una zona en la cual la cantidad de agua y nutrientes es elevada y la escorrentía es menor. En estas condicio-

nes, la semilla de la *E. pycnophylla* subsp. *angelensis* tiene mayor probabilidad de germinar. Esto hace que la densidad poblacional promedio sea mayor y por lo tanto la competencia por nutrientes también lo sea, causando una altura menor. Adicionalmente, esta especie desarrolló una estrategia de reclutamiento en la que únicamente las semillas con mayor probabilidad de germinar son las que caen. Al existir una zona escasamente poblada, esta estrategia les permite obtener un mayor dominio sobre el área, con respecto a otras especies<sup>18</sup>.

### **Interacción de *Espeletia pycnophylla* subsp. *angelensis* con el ecosistema**

Aunque los páramos son ambientes inhóspitos dominados por plantas secas y muertas, varios estudios demuestran que *E. pycnophylla* subsp. *angelensis* es de vital importancia para otras especies que allí habitan<sup>19</sup>. Muchos animales que habitan en este ecosistema, usan a las plantas de esta subespecie como fuente de comida y protección.

El tallo de *E. pycnophylla* subsp. *angelensis* por estar cubierta de hojas secas y viejas, es considerado el refugio perfecto para macro-artrópodos. De acuerdo a un estudio realizado por Smithers et al. XX, existen los huéspedes permanentes y visitantes que utilizan las plantas como refugio durante la noche. El estudio demuestra que la distribución de estos huéspedes, así como su abundancia varía conforme la edad de la planta. Smithers encontró a grupos de macro-artrópodos como Arañas (*Araneae*), Coleópteros (*Coleoptera*) y Orugas (*Lepidoptera larvae*). *Araneae* fue encontrado en mayor cantidad en la parte superior de la cubierta de hojas secas, junto a una gran cantidad de otros invertebrados, lo que proveía una gran concentración de presas para ellos. Los dípteros (moscas) en cambio se encontraron en los frailejones de 1 metro de altura y los Pseudoscorpionidae (falsos escorpiones) se encontraron en mayor abundancia en el centro de la cubierta de hojas secas.

En adición a su función de hábitat, *Espeletia* aporta de distintas maneras al ecosistema. Su establecimiento natural de evita la erosión de los páramos causada por el sobre enfriamiento y el descongelamiento. Sus raíces ayudan a estabilizar el suelo, contribuyendo con el aporte de materia orgánica e impidiendo que se acumulen sedimentos en los ríos. Sus flores son atractivas para aves e insectos polinizadores. Debido a su mecanismo de canalización del agua de la lluvia, contribuye a las nacientes de los ríos y su mecanismo de aprovechamiento de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> le convierten en una planta perfecta para combatir el calentamiento global<sup>10</sup>.





### Procesos que transforman el páramo e influyen la especie.

El suelo de los páramos actúa como esponja haciendo que en invierno sean capaces de absorber agua y en verano abastecer ante escasez de lluvias<sup>21</sup>. Adicionalmente, el páramo puede almacenar CO<sub>2</sub> atmosférico, controlando así el calentamiento global<sup>22</sup>. El páramo está amenazado por el avance y la mala práctica de la actividad agropecuaria, la cacería, la pesca ilegal, el turismo descontrolado, la apertura de carreteras, el incremento de la temperatura del aire, las lluvias frecuentes e intensas y los períodos secos más largos. Estas amenazas han provocado la pérdida de la cobertura vegetal, erosión del suelo, contaminación del agua, pérdida y desplazamiento de la fauna silvestre, disminución de la población de venados, alteración de caudales en las fuentes de agua y estrés de la vegetación<sup>7</sup>. El cambio climático es la amenaza más peligrosa debido al alto índice de vulnerabilidad con respecto a los bosques de la Cordillera Occidental de los Andes, los venados, y, principalmente los frailejones. Como se describió anteriormente Espeletia cumple un papel fundamental en los servicios ecosistémicos que brinda el páramo, por lo tanto, la amenaza a esta especie afecta directamente a su equilibrio. Según el plan de manejo de la REEA<sup>7</sup> los daños al páramo afectan a la especie entre el 71 y 100% de su población, los efectos que provocan estos daños, necesitan de 6 a 20 años para revertirse y han reducido la población de frailejones en un 30% en los últimos diez años. Es necesario un plan de acción mediante la legislación especial para proteger los ecosistemas de tipo páramo<sup>23</sup>.

### Conclusiones

*Espeletia pycnophylla* habita en el Ecuador, concentrándose mayormente en la Reserva Ecológica El Ángel que es una de las reservas más importantes país por su característica de páramo. El páramo es fundamental para la biodiversidad gracias a su participación en el ciclo del agua y su contribución a disminuir los efectos del cambio climático. De esta región es endémica la subespecie *Espeletia pycnophylla subsp. Angelensis*. Se pudo ver que, al ser parte del género *Espeletia, susp. angelensis* ha logrado adaptarse de manera impresionante a los ambientes extremos del páramo, a través de técnicas como reclutamiento de semillas, sobre enfriamiento y yema nocturna. Estudios demuestran que esta subespecie es única con respecto al crecimiento en función de la gradiente altitudinal y que es el hogar de varios macro artrópodos



Figura 3. Dibujo de *Espeletia pycnophylla* y sus partes

y otros insectos. Todo el género de las *Espeletia*, así como también su hábitat, está en peligro debido a la actividad del hombre, y a los efectos del cambio climático como temporadas secas o lluvias torrenciales. Es necesario un plan de acción para proteger a esta especie endémica de la región andina y al páramo que es uno de los ecosistemas representativos del sector. Finalmente, se requieren más estudios sobre *subsp. angelensis* y su papel biológico en el páramo, además de campañas para incentivar el cuidado y la visita de su hábitat la Reserva Ecológica El Ángel.



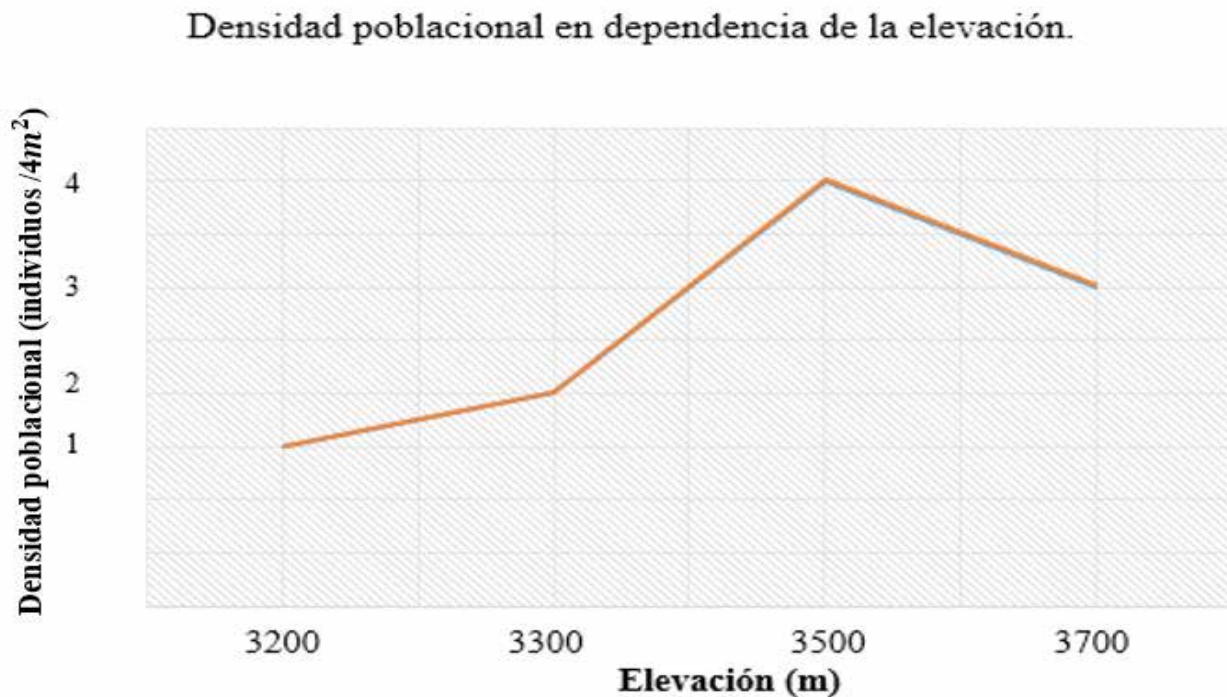


Figura 4. Variación coenoclínica de la densidad poblacional promedio de *E. pycnophylla ssp. Angelensis*<sup>18</sup>

## Referencias bibliográficas

- Sierra, R. (Ed.). (1999). Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuador continental. Proyecto INEFAN/GEF-BIRF y EcoCiencia. Quito, Ecuador.
- Hofstede et al. (2014). Los páramos Andinos ¿Qué sabemos? Estado de conocimiento sobre el impacto del cambio climático en el ecosistema páramo. UICN, Quito, Ecuador.
- Jørgensen, P.M. & S. León-Yáñez (eds.). (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 75: i–viii, 1–1182.
- Ministerio del Ambiente (2012). Sistema de clasificación de los ecosistemas del Ecuador continental. Quito: Subsecretaría de Patrimonio Natural.
- Registro guardaparques REEA 2009-2013 tomado de: Ministerio del Ambiente (2015). Plan de manejo de la Reserva Ecológica El Ángel. Quito: Subsecretaría de Patrimonio Natural
- The IUCN Red List of Threatened Species, Tirira (2011).
- Ministerio del Ambiente (2015). Plan de manejo de la Reserva Ecológica El Ángel. Quito: Subsecretaría de Patrimonio Natural
- Lutyn, J. (1999). Páramos: A checklist of plant diversity, geographic distribution, and botanical literature. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 84: 1-278.
- Medina, G. & P. Mena. 2001. Los páramos del Ecuador. Pp. 1-23 En: Mena, P., G. Medina & R.G.M. Hofstede (eds.). *Los Páramos del Ecuador*. Proyecto Páramo y Abya Yala, Quito.
- Llambí, D., Soto-W, A., Céleri, R., De Bievre, B., Ochoa, B. & Borja, P. (2012). Páramos Andinos: Ecología, hidrología y suelos de páramo. Proyecto páramo andino.
- Podwojewski, P. & J. Poulenard. 2000a. La degradación de los suelos de los páramos. *Serie Páramo (Suelos)* 5: 27-36.
- Cuatrecasas J. 1986. Speciation and radiation of the Espeletinae in the Andes. Pp. 267–303. En: Vuilleumier F, Monasterio M (eds.). *High altitude tropical biogeography*. Oxford University Press. New York, U. S. A.
- García, N., Calderón, E. & Galeano, G. (2005). Libro rojo de plantas de Colombia. Vol 2: Palmas, frailejones y zamias. Instituto Humboldt: Bogotá.
- Monasterio, M. & Sarmiento, L. (1991) Adaptive radiation of *Espeletia* in the cold Andean Tropics. *Tree*, 6: 387-391
- Ramsay, P. M. (2001) Diurnal temperature variation in the major growth forms of an Ecuadorian páramo plant community. In: Ramsay, P.M. (Ed.), *The Ecology of Volcán Chiles: high-altitude ecosystems on the Ecuador-Colombia border*, pp. 101–112. Plymouth: Pebble & Shell.
- Smith, A.P. (1979) Function of the Dead Leaves in *Espeletia schultzei* (Compositae) an Andean Caulescent Rosette Species. *Biotropica*, 11: 43–47.
- Beck, E. (1994) Cold tolerance in tropical alpine plants. In: Rundel, P.W., Smith, A.P. and Meinzer, F.C. (Eds.) *Tropical Alpine Environments: Plant Form and Function*, pp. 77–110. Cambridge: Cambridge University Press.
- Benavides-Martínez, Iván F., Burbano-Martínez, Diana L., Urbano-Apráez, Sandra M., & Solarte-Cruz, María E.. (2007). Efecto del gradiente altitudinal sobre aspectos autoecológicos de *Espeletia pycnophylla ssp. angelensis* cuatrec (Asteraceae) en el páramo El Infiernillo (Nariño-Colombia). *Actualidades Biológicas*, 29(86), 41-53. Recuperado Diciembre 10, 2016, desde [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0304-35842007000100004&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-35842007000100004&lng=en&tlng=es).
- Lutyn, J.L. (1999) Páramos: a checklist of plant diversity, geographical distribution, and botanical literature, New York: New York Botanical Garden Press.
- P.M. Ramsay (ed.). (2001). Macro-arthropod communities of the giant rosette plant, *Espeletia pycnophylla* subsp. *angelensis*. En *The Ecology of Volcán Chiles: high-altitude ecosystems on the Ecuador-Colombia border*. Plymouth: Pebble & Shell. Pp. 169-175.
- Greenpeace. (2009) Cambio climático: futuro negro para los páramos. Colombia. recuperado el 3 de diciembre del 2016 desde: [http://www.greenpeace.org/colombia/Global/colombia/informes/informe\\_todo3.pdf](http://www.greenpeace.org/colombia/Global/colombia/informes/informe_todo3.pdf).
- Hofstede, R., Segarra, P. & Mena, P. (Eds) (2003). *Los páramos del mundo*. Proyecto Atlas Mundial de los Páramos. Quito, Ecuador: Global Peatland initiative/NC.IUCN/ EcoCiencia
- Hofstede, R., & Mena, P. (2000). Los beneficios escondidos del páramo: servicios ecológicos e impacto humano. II conferencia electrónica sobre usos sostenibles y conservación del ecosistema páramo en los Andes: Los páramos como fuente de agua, mitos, realidades, retos y acciones. Lima, Peru;

Recibido: diciembre 2016

Aprobado: febrero 2017

# BIOMOL®

Somos distribuidores exclusivos de equipos, reactivos e insumos para líneas de investigación en Biología Molecular Forense, Biotecnología e Identidad Genética.

Podemos cubrir todos los requerimientos para equipamiento completo de laboratorios con tecnología de punta.

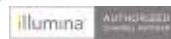
El personal de BioMol Ecuador Cia. Ltda. Esta constituido por biólogos especializados en Biología Molecular, Microbiología e Identidad genética.



**BIOMOL®**  
BioMOL ECUADOR CIA. LTDA.

## MARCAS CON LA MÁS ALTA GARANTÍA TÉCNICA Y CIENTÍFICA

Genómica, análisis expresión de proteínas, biología molecular e identidad genética.



Equipos y reactivos de NGS & Microarreglos para investigación y aplicaciones diagnósticas.

Filtración de laboratorio, Tarjetas de colección de muestras y kits, membranas de blotting.



Distribuidor Autorizado  
GE Healthcare

Análisis celular fotodocumentación, investigación en Proteómica, DNA, RNA, Cromatografía, sistemas de blotting.

Anticuerpos primarios/ secundarios, Bioquímicos, y Suministros generales para Laboratorio.



Soluciones automatizadas de pipeteo, Kits de pipetas, Pipetas especializadas, Bombas peristálticas.

Síntesis oligos DNA/RNA, Secuenciación DNA, Next Generation Sequencing, Secuenciación RNA (ILLUMINA), Sondas qPCR.



Material e insumos para crioconservación, filtración, cultivo celular y material para laboratorio. Consumibles de plástico certificados libres de ADNasa / RNasa y pirógenos.

Células madre adultas, células madre pluripotentes, Cultivo Celular, Detección de endotoxinas, (OGM).



Cámaras de electroforesis horizontal y vertical, Sistemas de Detección de mutaciones, estación de trabajo de PCR sistemas Blotting.

Reactivos para ciencias forenses.



Automatización y manejo de fluidos.

Fábrica productos innovativos para el aislamiento y el análisis de ácidos nucleicos: DNA, RNA y proteínas.



Software forense que permite realizar servicios operacionales, de consultoría y administración en el terreno de ADN forense y problemas de identificación rápida y precisa.

**Clinical biotec en conjunto con la Universidad de las Américas (UDLA)** ofrece el curso Inicial para establecer las bases científicas en el desarrollo actual de los Ensayos Clínicos :

**ESTRUCTURA Y ENTORNO DE LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA. CONCEPTOS BÁSICOS EN LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA.**

Primer módulo: Se trabajará en la adquisición de los conceptos básicos necesarios y relacionados con el desarrollo preclínico sus conceptos y etapas en las que se realizan dentro de la investigación clínica. Además se desarrollaran los conceptos básicos Ensayos Clínico de eficacia y seguridad dentro de este tipo de investigación y el método científico en los Ensayos Clínicos.

**Conferencias:**

- 1) Investigación Clínica: Desarrollo de fármacos y Biofármacos.
- 2) Preclínica concepto fases y etapas a desarrollar en la concepción de los productos farmacéuticos.
- 3) Ensayos Clínicos: Concepto y Generalidades

**- ORGANISMOS Y ACTORES PARTICIPANTES EN LOS ENSAYOS CLÍNICOS: ENTORNO REGULATORIO**

Segundo Modulo: Introducción al entorno de la Industria Farmacéutica a nivel nacional e internacional, conocimiento de los diferentes actores, organizaciones, actividades, funciones, normativas que regulan esta investigación a nivel Nacional e Internacional.

Se abordarán con detalle las estructuras y organigramas profesionales que participan en el desarrollo y gestión de los Ensayos Clínicos.

Se plantearán con gran detalle los diferentes aspectos éticos y legales, a nivel local, europeo e internacional. Legislación FDA, EMEA y AEMPS. GCP, ICH, Declaración de Helsinki

**Conferencias:**

- 4) Aspectos éticos y Legales de los Ensayos Clínicos.
- 5) Entorno regulatorio de los E. Clínicos, Agencias Reguladoras Internacionales y Nacional.

**- DISEÑO Y FASES DE LOS ENSAYOS CLÍNICOS**

Introducción al conocimiento en los diferentes tipos de Ensayos Clínicos y proyectos de investigación, así como sus diferentes fases de desarrollo y procedimientos de gestión y ejecución. Conocimiento detallado de los elementos diferenciales en cuanto al tipo de estudio, diseño, objetivos y área terapéutica.

- 6) Diseño, aleatorización y tipos de Ensayos Clínicos.
- 7) Diseños estadísticos en los Ensayos Clínicos y sus Variables.
- 8) Fases de los Ensayos Clínicos
- 9) Estudios Observacionales y Epidemiológicos.

**- DOCUMENTOS ESENCIALES PARA LA APROBACIÓN DE LOS ENSAYOS CLÍNICOS**

Cuarto Modulo: Abordaremos la documentación actual y aplicable al desarrollo y aprobación de los Ensayos Clínicos por medio de ejemplos prácticos.

Documentos esenciales para el desarrollo y procesos de aprobación de los diferentes tipos de estudio

Manejo de los ICH.

10) Documentos esenciales en los Ensayos clínicos: Protocolo, Manual Farmacéuticos, Cuadernos de Recogida de Datos y Formulario de Consentimiento Informado

11) Escritura de Informe Final y Análisis Interinos. Publicación de los Ensayos Clínicos.

Nota: Todo el curso estará basado en actividades prácticas referentes a trabajos presentados por los estudiantes e interacciones con los profesores a partir del aula virtual.

Metodología: 40 horas total, 20 horas presencial 50% y 20 horas ONLINE 50%. Se activarán aulas virtuales semanalmente y cada alumno tendrá la posibilidad de solicitar a su Tutor, tutorías virtuales según se requieran en dependencia de la complejidad del tema. .

**PERFIL DEL ESTUDIANTE:**

El curso estará dirigido hacia Titulados Superiores, preferentemente en el área de Ciencias de la Salud preferentemente en Medicina aunque igualmente lo puede recibir profesionales afines o que se desarrollen dentro del campo de la Investigación Clínica. (Biología, Farmacia etc.), enfocados a la realización de los ensayos clínicos con sus diversas aristas relacionadas con el desarrollo clínico como investigadores y departamentos médico-científicos con presencia en un mercado global y colaborando en la correcta ejecución de protocolos internacionales de investigación clínica.



Biotecnología

Investigaciones Biomédicas

Ensayos clínicos

Todo para la industria farmacéutica - desde el lab a los ensayos clínicos



 clinical Biotec



<http://clinicalbiotec.com/>

<https://twitter.com/clinicalbiotec>

<https://www.facebook.com/bioclinal/>