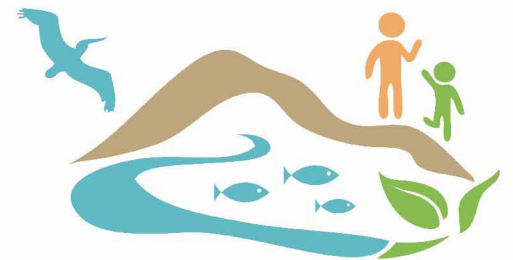


Vol. 2 No. 2 2017

ISSN:1390-9347

# Bionatura



22 MAY 2017  
INTERNATIONAL DAY  
FOR BIOLOGICAL DIVERSITY  
Biodiversity and Sustainable Tourism



*Amblyrhynchus cristatus*,  
el único lagarto marino del mundo

The Galápagos Islands:  
relatively untouched, but increasingly endangered

Plántulas de Guaijí (*Couepia subcordata*)

Ozonoterapia en patologías de columna

Suelos contaminados por minería

Ríos Machángara y Monjas. Quito

Cultivos masivos de camarón en Ecuador



[clinicalbiotec.com](http://clinicalbiotec.com) Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente

<http://www.revistabionatura.com/> <https://www.facebook.com/bionaturajournal/> <https://twitter.com/rbionatura>

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

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

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

**Contacto de aplicaciones:**  
**Spiros Agathos, Ph.D**  
[sagathos@yachaytech.edu.ec](mailto:sagathos@yachaytech.edu.ec)

## LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

- BIOLOGÍA BÁSICA
- BIOLOGÍA MARINA
- MICROBIOLOGÍA APLICADA
- APLICACIONES BIOMÉDICAS
- CONVERSIÓN DE LA BIOMASA
- ENFERMEDADES INFECCIOSAS
- TECNOLOGÍA BIOFARMACÉUTICA
- PRODUCTOS BIOFARMACÉUTICOS
- EVOLUCIÓN Y GENÓMICA VEGETAL
- RESISTENCIA A LAS ENFERMEDADES
- INGENIERÍA GENERAL DE LOS DISPOSITIVOS
- ELECTRÓNICA MÉDICA Y NANO-DISPOSITIVOS
- SALUD Y DIVERSIDAD DE LA FLORA Y FAUNA MARINA
- CIENCIAS BOTÁNICAS, GENÉTICA DE PLANTAS Y MEJORAMIENTO DE CULTIVOS
- IMAGENOLÓGÍA, NANO EQUIPOS, MECÁNICA DE MICRO FLÚIDOS Y DISEÑO BIOMIMÉTICO (BIOINSPIRADO)



Campus Universitario, Urcuquí Ec.



Jardín Botánico Yachay



Árbol Filogenético - Jardín Botánico

# 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.  
 -Dra. Hortensia María Rodríguez Cabrera. Ph.D. Full Professor and Dean, School of Chemical Sciences and Engineering 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. 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 investigador. 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 Transferencia de Tecnología. Dirección General at Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY), México.  
 -Dr. Javier Menéndez. Manager Specialist Process and Product 5cp. Sanofi Pasteur, Canadá.  
 -Dr. Fran Camacho. PHD Researcher. Universidad de Concepción, Chile  
 -Dr. Pedro Valiente. Profesor investigador. Facultad de Biología. Universidad de la Habana, Cuba.  
 -Dr. Diógenes Infante. Prometeo / SENESCYT. Especialista de primer nivel en Biotecnología. Universidad de Yachay Tech, Ecuador.  
 -Dra. María Elena Fleitas Mesa. Profesora 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  
 -Dr. Felipe Rojas Rodas. PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia  
 -Dra. Isabel Cristina Zapata Vahos, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia  
 -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/mbelvancouver.htm#ilustraciones%20 \(figura\)](http://www.fisterra.com/recursos_web/mbelvancouver.htm#ilustraciones%20(figura))

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

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

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

Nuestros contactos deben ser dirigidos a:

**Revista Bionatura: editor@revistabionatura.com**

ISSN: 1390-9347 (Versión impresa)

Formato: 21 x 29,7 cm

ISSN: 1390-9355 (Versión electrónica)

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

Publicación periódica trimestral

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

**Instrucciones a los autores en:**

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

**Asistente de publicación / Publication assistant**

Evelyn Padilla Rodriguez ([sales@revistabionatura.com](mailto:sales@revistabionatura.com))

## ÍNDICE / INDEX

### EDITORIAL

- Día Internacional de la Diversidad Biológica 22 de mayo** **283**  
*International Day for Biological Diversity 22 May*  
*Naciones Unidas*

### CARTA AL EDITOR

- The Galápagos Islands: relatively untouched, but increasingly endangered** **284**  
*Las Islas Galápagos: relativamente intactas, pero cada vez más amenazadas*  
*Markus P. Tellkamp*

### INVESTIGACIÓN

**Caracterización molecular y criopreservación de hongos y bacterias asociados a la rizósfera de especies vegetales acumuladoras de metales pesados en suelos contaminados por minería**

*Molecular characterization and cryopreservation of fungi and bacteria associated to the rhizosphere of heavy metal accumulation vegetable species in soils contaminated by mining*

*José Francisco Ochoa, Aminael Sánchez-Rodríguez*

**288**

**Germinación y crecimiento inicial de plántulas de Guaijí (*Couepia subcordata*) bajo condiciones de vivero**

*Germination and initial growth of Guaijí (*Couepia subcordata*) seedlings under nursery conditions*

*Jaime Naranjo Morán, Eduardo Chica Martínez*

**296**

**Evaluation of two-different affinity chromatographic columns based on Protein A for the purification of an IgG2a monoclonal antibody from ascites**

*Evaluación de dos columnas cromatográficas de afinidad diferentes basadas en la Proteína A para la purificación de un anticuerpo monoclonal IgG2a de ascitis.*

*Oscar Otero Alfaro, Fidel Ramírez Bencomo, Elizabeth González Aznar, Rosabel Falcón, Reinaldo Acevedo*

**299**

**Evaluación físico-química y microbiológica de la calidad del agua de los ríos Machángara y Monjas de la red hídrica del distrito metropolitano de Quito**

*Physic chemical and microbiological assessment of water quality in Machángara and Monjas rivers from Quito's metropolitan distric*

*Andrea Campaña, Ekaterina Gualoto y Viviana Chiluisa-Utreras*

**305**

### REPORTE DE CASOS

**Ozonoterapia en patologías de columna: Revisión de casos**

*Ozone therapy in diseases of spine: Review of cases*

*Danilo Ruiz Reyes, María Elena Romo*

**312**

---

## ARTÍCULO DE REVISIÓN

---

### **Estrategias Naturales para Mejorar el Crecimiento y la Salud en los Cultivos Masivas de Camarón en Ecuador**

*Natural strategies to Improve Growth and Health in Massive Shrimp Cultures in Ecuador*

**318**

*Franklin Luis E. Trujillo, Leonor Rivera, Eugenio Hardy, Erika M. Llumiquinga, Francisco Garrido, Jesús A. Chávez, Víctor H. Abril, José M. País-Chanfrau*

---

### **Consideraciones en el tratamiento anestésico en pacientes sometidos a tiroidectomía transoral**

**326**

*Anesthetic Considerations for treatment in patients undergoing thyroidectomy transoral*

*Secundino González Pardo, Silvana Paspuel Yar, Adonis Frómeta Guerra, Sandra Amalia Sánchez Figueredo*

---

## NEWS AND VIEWS

---

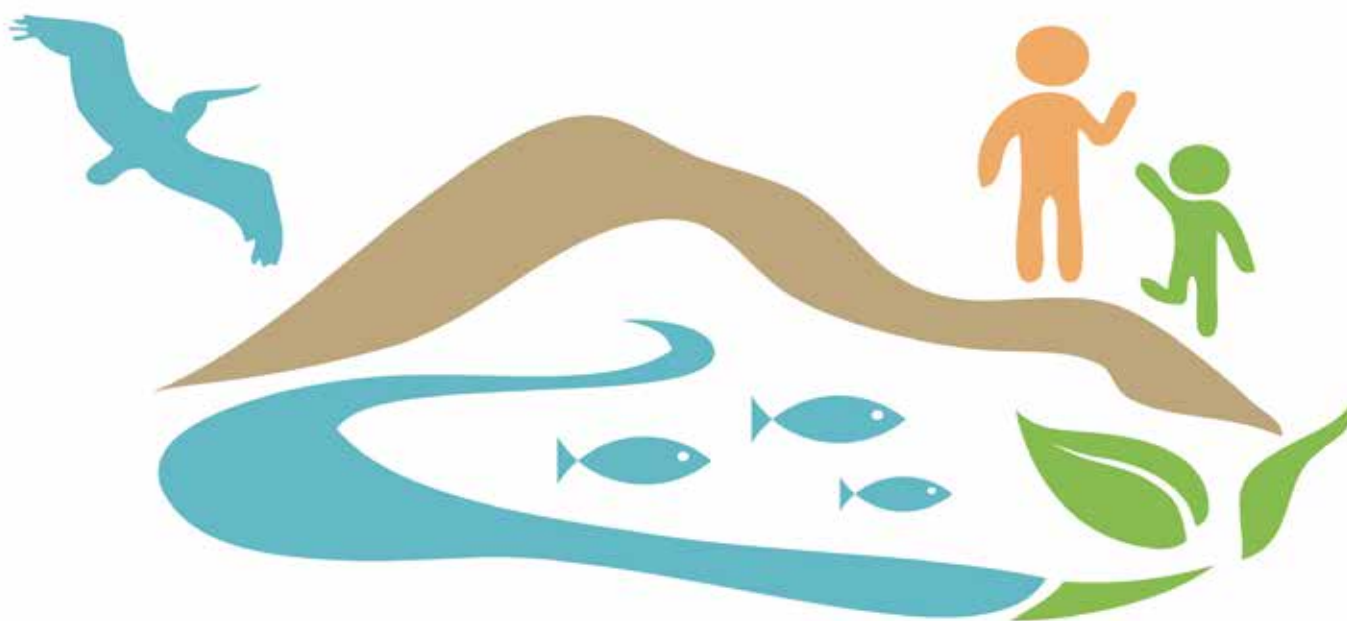
### ***Amblyrhynchus cristatus*, el único lagarto marino del mundo**

*Amblyrhynchus cristatus, the only sea lizard in the world*

*Odalys Torres*

**333**

---



**22 MAY 2017**

**INTERNATIONAL DAY**

**FOR BIOLOGICAL DIVERSITY**

**Biodiversity and Sustainable Tourism**

## EDITORIAL

# Día Internacional de la Diversidad Biológica 22 de mayo International Day for Biological Diversity 22 May

Naciones Unidas

## Biodiversidad y turismo sostenible

La diversidad de especies, ecosistemas y paisajes atrae al turismo y fomenta el crecimiento económico. A su vez, un sector turístico bien gestionado contribuye de manera significativa a proteger la flora y la fauna, incluso a aumentar las poblaciones de determinadas especies claves, además de concienciar acerca del valor de la biodiversidad a través de los ingresos que genera el turismo.

La celebración del Día Internacional para la Diversidad Biológica nos brinda la oportunidad de resaltar los beneficios que el turismo sostenible tiene para el crecimiento económico, así como para la conservación y el uso sostenible de la biodiversidad.

Este vínculo entre biodiversidad y turismo sostenible coincide con la declaración de 2017 como el Año Internacional del Turismo Sostenible para el Desarrollo.

## ¿Por qué un Día Internacional para la Diversidad Biológica?

Si bien cada vez somos más conscientes de que la diversidad biológica es un bien mundial de gran valor para las generaciones presentes y futuras, el número de especies disminuye a un gran ritmo debido a la actividad humana.

El Convenio sobre la Diversidad Biológica es el instrumento internacional para «la conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes y la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos», que ha sido ratificado por 196 países.

Dada la importancia de la educación y la conciencia pública para la aplicación del Convenio a todos los niveles, la Asamblea General proclamó el 22 de mayo, fecha de la aprobación del texto, Día Internacional de la Diversidad Biológica, mediante la resolución 55/201 de 20 de diciembre de 2000.

## Biodiversidad y Objetivos de Desarrollo Sostenible

Detener la pérdida de biodiversidad y promover el uso sostenible de los ecosistemas terrestres y de agua dulce están incluidos en el Objetivo de Desarrollo N°15.

## Biodiversity and Sustainable Tourism

Diversity in species, ecosystems and landscapes attracts tourism and promotes economic growth. In turn, a well-managed tourist sector can help reduce threats to key wildlife populations, and can maintain or increase biodiversity, through tourism revenue.

The celebration of the International Day for Biological Diversity under the theme “Biodiversity and Sustainable Tourism” is an opportunity to raise awareness of the important contribution of sustainable tourism both to economic growth and to the conservation of biodiversity.

This theme has been chosen to coincide with the observance of 2017 as the International Year of Sustainable Tourism for Development and can contribute to ongoing initiatives such as the Sustainable Tourism Programme.

## Why an International Day for Biological Diversity?

While there is a growing recognition that biological diversity is a global asset of tremendous value to present and future generations, the number of species is being significantly reduced by certain human activities.

The Convention on Biological Diversity is the international legal instrument for “the conservation of biological diversity, the sustainable use of its components and the fair and equitable sharing of the benefits arising out of the utilization of genetic resources” that has been ratified by 196 nations.

Given the importance of public education and awareness for the implementation of the Convention, the General Assembly proclaimed 22 May, the date of the adoption of its text, as the International Day for Biological Diversity by its resolution 55/201 of 20 December 2000.

## Biodiversity and the Sustainable Development Goals

The objectives of halting biodiversity loss and promoting the sustainable use of terrestrial and inland freshwater ecosystems are included in Sustainable Development Goal N°15. La Universidad

## Referencias bibliográficas

1. Día Internacional de la Diversidad Biológica». Organización de las Naciones Unidas.

## CARTA AL EDITOR

## The Galápagos Islands: relatively untouched, but increasingly endangered

Las Islas Galápagos: relativamente intactas, pero cada vez más amenazadas

Markus P. Tellkamp

DOI. 10.21931/RB/2017.02.02.2

Hardly any place on the planet evokes a sense of mystique and wonder like the Galápagos Islands (Figure 1). They are the cradle of evolutionary thought. They also are home to an unusual menagerie of animals, such as prehistoric-looking iguanas that feed on algae, giant tortoises, the only species of penguin to live on the equator, a flightless cormorant, a group of unique and famous finches, furtive and shy rice rats, sea lions and fur seals. Visitors have to be careful not to step on the oxymoronically extremely tame wildlife. Endemic plants, such as tree-like cacti, *Scalesia* trees and shrubs (relatives of sunflowers and daisies), and highland *Miconia* shrubs cover different island life zones. Around the world, people may not have heard much of Ecuador, the small South American country that proudly calls the islands its own, but they likely have heard of the famed Galapagos. Apart from the extraordinary sensation of experiencing wildlife up close, however, what makes these islands so special?

To answer this question, it is worthwhile to compare the Galápagos Islands to other islands of the Pacific region. The most obvious comparison is with the Hawaiian Islands, an archipelago of similar geological hotspot origin but older. Although there are many examples, I focus here on two related groups of birds. Although others taxonomic groups mirror the general trends seen in these birds. In Hawaii as in the Galápagos, a group of finches has evolved and diversified by

adaptive radiation. No matter which way one chooses to look at these birds, the Hawaiian honeycreeper (*Fringillidae: Drepanidinae*) radiation is by far the more spectacular: about 40 colorful species of birds, some of which do (or did) not bear any resemblance to a 'typical' finch, occupy a variety of niches, feeding on nectar, snails, insects, fruits, leaves or combinations thereof<sup>1</sup>. Despite the magnificence of honeycreepers, the more commonly known example of adaptive radiation is that of the Galápagos finches (*Thraupidae*). A look at the current conservation status of these two groups of birds may reveal why. Of the 35 species of honeycreeper listed by the IUCN, representing only the historically known species, 16 are extinct, 12 are critically endangered, two endangered, and the remaining five vulnerable<sup>2</sup>. In practical terms, this means that you can visit the Hawaiian Islands without seeing a single honeycreeper. In contrast, the Galápagos Finches are all still very much extant and, with important exceptions, quite numerous. In fact, you can easily see five of the 14 species of Galápagos Finches during a morning stroll through the town of Puerto Ayora. The Galápagos finches thus allow for fine-grained and intricate analyses of their evolutionary history<sup>3</sup>. In contrast, a recent phylogenetic study<sup>4</sup> on the Hawaiian honeycreeper was limited in scope by the lack of genetic material from the extinct species (Figure 2).



**Fig. 1.** The Galápagos Islands are an archipelago of volcanic islands distributed on either side of the Equator in the Pacific Ocean surrounding the centre of the Western Hemisphere, 906 km west of continental Ecuador, of which they are a part.





Fig. 2. A female Common Cactus-Finch (*Geospiza scandens*) watches the author at lunch in Puerto Ayora, Santa Cruz Island.



**Fig. 3** A male Small Ground-Finch (*Geospiza fuliginosa*) searching for food in the arid zone of Santa Cruz Island.

In nearly every taxonomic group the pattern is the same: on the Galápagos Islands, far fewer extinctions have taken place and the populations of the extant species tend to be larger. Why are the finches and fellow endemic species on the Galápagos in better shape than their Hawaiian counterparts? The short answer is people. Polynesians colonized the lush tropical Hawaiian archipelago with nutrient rich volcanic soils about 1600 years ago<sup>5</sup>. Over the last two centuries, the human population there has even grown to an estimated population of 1,428,557 people by 2016<sup>6</sup>. In contrast, humans have shunned the dry, spiny, and desert-like Galápagos Islands for a long time. If Polynesians ever made it to the Galápagos Islands, they did not stay around. Nowadays, only 3% of the surface area of the islands can be settled by people, with the remaining Galapagos 97% being protected as a national park. A total of 25,244 people were registered during the 2015 census<sup>7</sup>. Now, the human population is tightly controlled on the Galápagos. Even for an Ecuadorean citizen, a trip to the islands feels more like an international trip than a national one. The little appeal the Galápagos had for people in the past is the main reason the flora and fauna is still quite intact (Figure 3).

Only about 13 species of terrestrial vertebrates have become extinct in historic time<sup>8</sup>, although entire populations of some species have been extirpated on some islands<sup>9</sup>. In the broad spectrum of human impact among all Pacific islands, the Galápagos are perhaps the least impacted. At the other extreme, having passed through a devastating anthropogenic cataclysm, we have the Easter Islands whose terrestrial ecosystems have been nearly completely transformed<sup>10</sup>. The Hawaiian Islands fall somewhere in between.

The fact that the islands are still largely intact should not be viewed with passive complacency. Anthropogenic processes have already been set in motion that are starting to threaten this fragile island ecosystem. First among them are introduced species that are displacing, infecting or eating native plants and animals. According to the Charles Darwin Station<sup>11</sup>, there are now nearly 2000 introduced species, some of which are wreaking serious havoc on the islands. For example, going back to the finches, one of the introduced parasites is now seriously threatening the famous Galápagos Finches, especially the critically endangered Mangrove Finch (*Camarhynchus heliobates*). The parasitic fly *Philornis downsi* has been identified as the main threat to survival of several finch species<sup>12</sup>. It may also be responsible for the extinction of the newly confirmed species of San Cristóbal Vermillion Flycatcher (*Pyrocephalus dubius*)<sup>13</sup>. In an attempt to eradicate invasive species, authorities are sometimes resorting to drastic measures. For example, tens of thousands of goats have been eliminated from several islands at great cost<sup>14</sup>. This well-meaning measure has had its ecological backlash, however. Officials from the Ministry of Agriculture, Fishing and Livestock have noted that in the absence of the introduced herbivore, the first plants to recolonize goat-ravished areas are introduced, invasive species which are outcompeting the native species. In addition, populations of Galápagos Hawks (*Buteo galapagoensis*) have diminished<sup>15</sup> as changes in habitat structure due to goat removal have made hunting for these animals more difficult<sup>16</sup>. Introduced species are perhaps the gravest problem, but the World Heritage Committee identified illegal and

unsustainable fishing, tourism, immigration, lack of education, and problematic governance as major threats as well<sup>17</sup>. Clearly, the islands require a creative and holistic approach for solving conservation problems. (Figure 4).

The Galápagos Islands are unique because of the limited damage people have done to its native flora and fauna. At the same time, they are increasingly under pressure from anthropogenic causes. In order to safeguard the islands into the future, a new generation of natural resource managers needs to be trained that is capable of using the latest technology and insights in the natural and social sciences<sup>18</sup> to properly solve the problems faced by the island's biota. In addition, the full potential for the islands to become a unique natural laboratory has not been realized yet. The Galápagos require modern laboratories in addition to an intellectual research environment that is wholly based on the islands. National and foreign scientists can contribute to safeguard the islands, not only by creating and sharing knowledge, but also by increasing awareness in the population, and attracting funds for research and conservation. For this to happen, the scientific community not only needs the right incentives (particularly ease of access) to invest in the islands, but they also need qualified islanders who can at some time run the future labs. Perhaps it is time for a "University of the Galápagos Islands?"

**All birds pictures used in this articles belongs to the author Markus P. Tellkamp**



**Fig. 4.** A female Common Cactus-Finch (*Geospiza scandens*; left) and a female Medium Ground-Finch (*Geospiza fortis*; right) looking for scraps just after patrons of restaurant left, Puerto Ayora, Santa Cruz.

## Referencias bibliográficas

- Pratt HD (2005) Hawaiian honeycreepers. New York: Oxford University Press.
- IUCN (2016) The IUCN red list of threatened species, Version 2016-3. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed on 26 April 2017.
- Lamichhaney S, Berglund J, Almén MS, et al. (2015) Evolution of Darwin's finches and their beaks revealed by genome sequencing. *Nature* 518: 371–375. doi:10.1038/nature14181
- Lerner HRL, Meyer M, James HE, et al. (2011) Multilocus resolution of phylogeny and timescale in the extant adaptive radiation of Hawaiian honeycreepers. *Current Biology* 21: 1838–1844. doi: 10.1016/j.cub.2011.09.039
- Kirch PV (1985) Feathered gods and fishhooks. Honolulu: University of Hawaii Press.
- U.S. Census Bureau (2016) Quick facts Hawaii. <https://www.census.gov/quickfacts/table/PST045215/15>. Accessed on 26 April 2017.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (2015) Galápagos tiene 25.244 habitantes según censo 2015. <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/galapagos-tiene-25-244-habitantes-segun-censo-2015/>. Accessed 19 April 2017.
- Jiménez-Uzcátegui G, Milstead B, Marquez C, et al. (2008) Galapagos vertebrates: endangered status and conservation actions. Pages 104–153 in Galapagos Report 2006-2007. Puerto Ayora: CDF, GNP and INGALA. [http://www.darwinfoundation.org/media/filer\\_public/12/60/1260db98-2811-46d1-8c3b-0c3b9cf9ecb3/galapagos\\_report\\_2006-2007\\_english.pdf](http://www.darwinfoundation.org/media/filer_public/12/60/1260db98-2811-46d1-8c3b-0c3b9cf9ecb3/galapagos_report_2006-2007_english.pdf). Accessed on 26 April 2017.
- Steadman DW, Stafford TW, Donahue DJ & Jull AJT (1991) Chronology of Holocene Vertebrate Extinction in the Galapagos Islands. *Quaternary Research* 36: 126-133. [https://doi.org/10.1016/0033-5894\(91\)90021-V](https://doi.org/10.1016/0033-5894(91)90021-V)
- Steadman DW (1995) Prehistoric extinctions of Pacific island birds: biodiversity meets zooarchaeology. *Science* 1123–1131. doi: 10.1126/science.267.5201.1123
- Gardener M, Causton C, Atkinson R, Guézou A (2011). CDF Checklist of Galapagos Introduced Species - FCD Lista de especies de Especies Introducidas de Galápagos. In: Bungartz F, Herrera H, Jaramillo P, et al. (eds.). Charles Darwin Foundation Galapagos Species Checklist. Puerto Ayora: Charles Darwin Foundation <http://darwinfoundation.org/datazone/checklists/introduced-species/> Last updated 05 Jul 2011
- Fessl B & Tebbich S (2002) *Philornis downsi* – a recently discovered parasite on the Galápagos archipelago – a threat for Darwin's finches? *Ibis* 144: 445–451. doi:10.1046/j.1474-919X.2002.00076.x
- Carmi O, Witt CC, Jaramillo A & Dumbacher JP (2016) Phylogeography of the Vermilion Flycatcher species complex: Multiple speciation events, shifts in migratory behavior, and an apparent extinction of a Galápagos-endemic bird species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 102: 152–173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2016.05.029>
- Carrion V, Donlan CJ, Campbell KJ, et al. (2011) Archipelago-wide island restoration in the Galápagos Islands: reducing costs of invasive mammal eradication programs and reinvasion risk. *PLoS ONE* 6(5): e18835. doi:10.1371/journal.pone.0018835
- Rivera-Parra JL, Levenstein KM, Bednarz JC, et al. (2012) Implications of goat eradication on the survivorship of the Galapagos hawk. *Journal of Wildlife Management* 76: 1197–1204. doi: 10.1002/jwmg.372
- Jaramillo M, Donaghy-Cannon M, Vargas F H & Parker PG (2016) The diet of the Galapagos Hawk (*Buteo galapagoensis*) before and after goat eradication *Journal of Raptor Research* 50: 33–44. doi: 10.3356/rapt-50-01-33-44.1
- Strahm W & Patry M (2010) World Heritage Centre/IUCN Reactive Monitoring Mission Report Galapagos Islands 27 April–6 May 2010. Paris: World Heritage Center UNESCO. <http://whc.unesco.org/en/documents/104554>.
- Watkins G (2008) A paradigm shift in Galapagos research. *Galapagos Research* 65: 30–36.

## INVESTIGACIÓN

## Caracterización molecular y criopreservación de hongos y bacterias asociados a la rizósfera de especies vegetales acumuladoras de metales pesados en suelos contaminados por minería.

Molecular characterization and cryopreservation of fungi and bacteria associated to the rhizosphere of heavy metal accumulation vegetable species in soils contaminated by mining.

José Francisco Ochoa<sup>1</sup>, Aminaél Sánchez-Rodríguez<sup>2</sup>.

DOI. 10.21931/RB/2017.02.02.3

## RESUMEN

Los microorganismos son un claro ejemplo de la enorme biodiversidad que contiene el suelo. Se procedió al aislamiento *in vitro*, caracterización molecular e identificación de microorganismos de suelo de rizósfera asociados a *Miconia zamorensis* y *Erato polymnoides*, considerados como acumuladores de metales pesados en la zona minera de Chinapintza - Zamora Chinchipe. Las cepas se identificaron mediante la secuenciación del gen 16S ARN ribosomal en bacterias, y se identificó la presencia de géneros como *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Serratia*. En hongos se utilizó la secuencia del gen ITS ARN ribosomal y se identificaron los géneros *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Nodulisporium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Umbelopsis* e *Hypochnicium*. Tales géneros forman parte del suelo y se consideran como tolerantes a ecosistemas con elevada contaminación de metales pesados. Nuestros resultados serán el punto de partida de información sobre la potencialidad que brindan estos microorganismos para desarrollar estrategias de biorremediación en la zona de estudio. Debido a la gran demanda de elaborar colecciones de microorganismos con fines de biorremediación, se planteó la criopreservación de los cultivos puros bacterianos y fúngicos. Se obtuvo una viabilidad efectiva en la reactivación de los cultivos bacterianos, mientras que en hongos la mayoría de cultivos fueron reactivados con éxito.

**Palabras clave:** Microorganismos de suelo, aislamiento *in vitro*, criopreservación, caracterización molecular, 16S ARN ribosomal, ITS ARN ribosomal.

## ABSTRACT

Microorganisms are a clear example of the enormous biodiversity contained in the soil. It proceeded to the *in vitro* isolation, molecular characterization and identification of microorganism's rhizosphere soil associated with *Miconia zamorensis* and *Erato polymnoides*, regarded as accumulators of heavy metals in the mining area of Chinapintza - Zamora Chinchipe. The strains were identified by sequencing the 16S ribosomal RNA gene in bacteria, and it was identified the presence of genera such as *Bacillus*, *Serratia* and *Lysinibacillus*. In fungi was used the sequence of ITS ribosomal RNA gene and it was identified the genera *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Nodulisporium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Hypochnicium* and *Umbelopsis*. Such genera form part of the soil and are considered as tolerant to ecosystems with heavy metals contamination. Our results will be the starting point of information on the potentiality of these microorganisms to develop bioremediation strategies in the study area. Due to the high demand to elaborate collections of microorganisms for bioremediation purposes, it was proposed the cryopreservation of bacterial and fungal pure cultures. It was obtained an effective viability in the reactivation of bacterial cultures, while in fungi most cultures were reactivated successfully.

**Keywords:** Soil microorganisms, *in vitro* isolation, cryopreservation, molecular characterization, 16S ribosomal RNA, ITS ribosomal RNA.

## Introducción

En Ecuador la actividad minera desorganizada y artesanal genera un alto grado de contaminación ambiental, sobre todo la relacionada con la extracción de oro produciendo un vertimiento muy elevado de mercurio al suelo y riachuelos cercanos a las áreas de extracción<sup>1</sup>. En la actualidad los ecosistemas contaminados están en el centro de atención tanto de gobernantes como de la comunidad científica y la creación de estrategias para recuperar y disminuir el impacto de la elevada contaminación por metales pesados es un

activo campo de investigación<sup>2</sup>.

El empleo de especies vegetales de por sí no es una estrategia de biorremediación con un balance costo/beneficio favorable<sup>3</sup>. Una alternativa para mejorar estrategias de remediación basadas en plantas acumuladoras de metales pesados consiste en asociar las plantas con microorganismos del suelo<sup>4</sup>. Estos microorganismos tienen la capacidad de facilitar el proceso de extracción de metales pesados por parte de la rizósfera de las plantas<sup>5</sup>. La rizósfera es considerada como un "punto caliente" de las actividades microbianas, en donde las interacciones entre las raíces y los microor-

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador

<sup>2</sup> MSZE Microbial Systems Ecology and Evolution / Ecología y Evolución de Sistemas Microbianos. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador

**Autor de correspondencia:** asanchez2@utpl.edu.ec

ganismos constituyentes del suelo (minerales y materia orgánica) tienen lugar<sup>5</sup>. En general, los microorganismos sirven como intermediarios entre la planta que requiere nutrientes o minerales solubles, y el suelo, que contiene los nutrientes necesarios pero a menudo en bajas concentraciones y formas inaccesibles para las plantas<sup>6</sup>. De este modo los microorganismos de la rizósfera proporcionan un enlace crítico entre las plantas y el suelo<sup>7</sup>. Por lo tanto, los microorganismos han desarrollado estrategias diversas que han propiciado el florecimiento de una serie de interacciones sinérgicas, tanto entre sí como con la planta<sup>7</sup>.

Los microorganismos consumen metales pesados de forma activa (bioacumulación) o pasivamente (adsorción)<sup>3</sup>. Por ello tienen la capacidad de inmovilizar metales por medio del secuestro o acumulación celular o a través de procesos de precipitación extracelular<sup>8</sup>. Los efectos de los metales pesados sobre las comunidades microbianas pueden tener consecuencias dramáticas para el funcionamiento de todo el ecosistema<sup>9</sup>. Si los metales se encuentran en concentraciones suficientemente altas pueden reducir el tamaño de las poblaciones microbianas, destruyendo sus estructuras y reduciendo sus actividades biológicas<sup>10</sup>. Por consiguiente la estrecha interacción entre los microorganismos de la rizósfera y las plantas conducen a un aumento en las actividades relacionadas con la recuperación de suelos contaminados<sup>11</sup>.

Basados en estos antecedentes, en el presente proyecto se decidió explorar la diversidad de comunidades microbianas asociadas a la rizósfera de especies vegetales acumuladoras de metales pesados en suelos contaminados, así como estrategias para su conservación en condiciones *in vitro* para facilitar aplicaciones de fitoremediación.

## Métodos

### Aislamiento *in vitro* de cultivos microbianos.

Se realizó el aislamiento de microorganismos de suelo de rizósfera de *Miconia zamorensis* y *Erato polymnoides* identificadas como especies acumuladoras de metales pesados en la zona minera de Chinapintza – Zamora Chinchipe (Ecuador). Se establecieron dos transectos de 50m<sup>2</sup>, ubicados en las coordenadas 4°02'16.6"S 78°34'14.9"W. Transecto A: suelo contaminado al margen de un caudal de agua que sirve de vertedero de residuales de la actividad minera. Transecto C: área ubicada 300m al norte del transecto A.

Las cepas se aislaron utilizando la técnica de dilución en serie y fueron cultivadas en cajas Petri con medios de cultivo específicos para bacterias (BBL™ Trypticase™ Soy Agar -TSA) y hongos (BD Difco™ Potato Dextrose Agar - PDA).

### Criopreservación y viabilidad de cepas bacterianas y fúngicas.

Los cultivos bacterianos y fúngicos puros fueron conservados en criotubos de almacenamiento y como crioprotectante se empleó el glicerol. Finalmente se procedió a colocar los criotubos en congelación a -80°C. Posteriormente fueron reactivadas al cabo de un periodo de tiempo en congelación. En bacterias fue después de 8 semanas mientras que en hongos fue en el lapso de 12 semanas. Tal proceso se realizó para medir la viabilidad del método de criopreservación empleado.

### Caracterización molecular de cepas bacterianas y fúngicas.

Los cultivos bacterianos y fúngicos puros fueron conservados en criotubos de almacenamiento y como crioprotectante se empleó el glicerol. Finalmente se procedió a colocar los criotubos en congelación a -80°C. Posteriormente fueron reactivadas al cabo de un periodo de tiempo en congelación. En bacterias fue después de 8 semanas mientras que en hongos fue en el lapso de 12 semanas. Tal proceso se realizó para medir la viabilidad del método de criopreservación empleado.

### Caracterización molecular de cepas bacterianas y fúngicas.

Se procedió a la obtención de ADN genómico de las cepas bacterianas y fúngicas reactivadas empleando el kit de extracción UltraClean Microbial DNA Isolation kit (MoBio) siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente se amplificó el ADN genómico mediante la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las cepas bacterianas se identificaron utilizando las secuencias del gen 16S ARN ribosomal. Las muestras de ADN fueron obtenidas para cada colonia individual de cada cepa y la amplificación del gen 16S ARN ribosomal se llevó a cabo por PCR. La amplificación del ADN se realizó utilizando el GoTaq PCR Kit (PROMEGA) utilizando las condiciones propuestas por<sup>12</sup>. La amplificación se realizó mediante el empleo de los siguientes primers: EUB338 (ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG) y EUB518 (ATT ACC GCG GCT GCT GG)<sup>12</sup>. Se empleó el termociclador (Applied Biosystem) y las condiciones fueron 94°C-9min por 1 ciclo; 94°C-45seg, 55°C-45seg, 72°C-45seg por 30 ciclos; 72°C-7min por 1 ciclo.

Las cepas fúngicas se identificaron utilizando las secuencias del gen ITS ARN ribosomal. La amplificación por PCR del ADN se realizó utilizando el GoTaq Pcr Kit (PROMEGA). La amplificación se realizó utilizando los primers ITS1F (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) y 5.8S (CGC TGC GTT CTT CAT CG)<sup>12</sup>. Se empleó el termociclador (ProFlex™ PCR System) con las siguientes condiciones: 95°C-2min por 1 ciclo; 95°C-1min, 50°C-30seg, 72°C-30seg por 40 ciclos; 72°C-5min por 1 ciclo.

Los productos de PCR amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las muestras que obtuvieron resultados positivos en relación a la observación de bandas fueron purificadas empleando el protocolo Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System siguiendo el protocolo del fabricante. Se obtuvo un volumen final de 30 µl por cada muestra que fue utilizada para la secuenciación.

### Secuenciación y análisis bioinformático de los fragmentos amplificados de los microorganismos.

Las muestras purificadas de productos de PCR se secuenciaron empleando el servicio de la compañía MacroGen, Korea (<http://www.macrogen.com/kor/>). Las secuencias bacterianas y fúngicas fueron analizadas utilizando la herramienta BLAST en la base de datos del NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para encontrar secuencias estrechamente relacionadas. Sobre la base de máxima identidad fueron seleccionadas las primeras cinco secuencias y alineadas conjuntamente con las secuencias de bacterias y de igual manera para los hongos, para ello se empleó la herramienta MAFFT (Versión 7, estrategia G-INS-i). Para la construcción de árboles filogenéticos se utilizó el método de Máxima Verosimilitud con 1000 réplicas de bootstrap, empleando el software de análisis genéticos MEGA6. Por medio de este análisis fue posible la identificación molecular de los microorganismos presentes en la rizósfera de las especies vegetales asociados a las muestras de suelo.

## Resultados

### Criopreservación y viabilidad de microorganismos aislados.

Para realizar un congelamiento efectivo es necesario mantener los microorganismos bajo ausencia de agua, lo que resultara en un estado de latencia de las células vivas para inhibir sus actividades bioquímicas<sup>13</sup>, proporcionando las condiciones necesarias para estabilizar a los microorganismos preservados inmovilizando o reduciendo el contenido de agua de las muestras almacenadas<sup>14</sup>. Esto concuerda con los resultados obtenidos en la criopreservación bacteriana debido a que se obtuvo un 100% de viabilidad en la reactivación de cada una de las muestras al

cabo del periodo en congelación. Entre los principales factores que permitieron tal recuperación se encuentra que se aplicó como crioprotectante al glicerol. Según<sup>15</sup> el glicerol mediante el aumento de la concentración total de solutos reduce la cantidad de hielo formada, que es la causa del daño al momento de someter a microorganismos a extremas temperaturas de congelación, y el glicerol protege a las células contra este daño. La eficacia del glicerol como crioprotectante depende de una serie de propiedades: (a) es un compuesto soluble en agua y puede permanecer así a bajas temperaturas con el fin de producir una profunda depresión del punto de congelación; (b) capacidad de penetración celular; y (c) posee una baja toxicidad de modo que se puede utilizar a elevadas concentraciones<sup>16</sup>.

En hongos de las 100 aislados sometidos a criopreservación únicamente fueron reactivados con éxito 90 muestras. Puede existir el caso que múltiples factores afecten la eficacia de la criopreservación que van desde procedimientos pre y post tratamiento. Estos incluyen, concentración del crioprotectante, fuentes de carbono y las intensidades de luz<sup>17</sup>. Durante la fase de congelación, la formación de cristales de hielo se produce, y es letal cuando se forma intracelularmente, por lo tanto la prevención de dicha formación es altamente deseable<sup>18</sup>. En el caso de hongos la criopreservación fue efectiva porque un alto porcentaje de muestras fueron viables, pero hubo el caso de muestras que no lo hicieron. Por ello se pudo dar el caso de que varios de los factores mencionados afectaron los cultivos y no permitieron una viabilidad efectiva.

En el caso de hongos y bacterias se empleó para la criopreservación diferentes concentraciones de glicerol. Para hongos fue empleado al 10% y se obtuvo resultados satisfactorios en la congelación y posterior reactivación de las colonias fúngicas. A una concentración del 10%, el glicerol permite que la solución congelada sea bastante sólida a  $-80^{\circ}\text{C}$ <sup>19</sup> y los hongos fueron cultivados en medio de agar previamente a ser almacenados, a esta concentración el glicerol cumple su función de evitar daños de congelación, tales como la formación de cristales de hielo<sup>20</sup>. Por otro lado las colonias bacterianas fueron sometidas a concentraciones más altas de glicerol (80%), ya que a concentraciones mayores al 50% el cultivo puede permanecer parcialmente líquido<sup>21</sup> y las bacterias fueron criopreservadas en medio de cultivo líquido.

### Identificación molecular bacteriana basado en la secuencia del gen 16S ARN ribosomal.

Un total de 27 secuencias de las muestras bacterianas fueron analizadas, las cuales fueron utilizadas para el análisis bioinformático. Se determinó que la mayoría de las secuencias presentaban una similitud mayor al 90% con las secuencias homólogas más cercanas en las bases de datos del GenBank. La identificación filogenética de los aislados bacterianos basados en la secuencia parcial del gen 16S de ARN ribosomal se muestran en la Tabla 1. El análisis de las secuencias del gen 16S ARN ribosomal permitió identificar los siguientes géneros: *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Serratia*.

### Identificación molecular fúngica basado en la secuencia (ITS) de la región de ARN ribosomal.

Un total de 41 secuencias de las muestras fúngicas fueron analizadas, las cuales fueron utilizadas para el análisis bioinformático. Se determinó que la mayoría presentaban una similitud mayor al 90% con las secuencias homólogas más cercanas en las bases de datos del GenBank. La identificación filogenética de los aislados fúngicos basados en la secuencia parcial del gen ITS de ARN ribosomal se muestran en la Tabla 2. El análisis de las secuencias del gen ITS ARN ribosomal permitió identificar los siguientes géneros: *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Nodulisporium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Umbelopsis*, e *Hypochnicium*.

Aislado	Fuente de aislamiento			Identificación filogenética*
	Especie vegetal	Transecto	Tipo de suelo de rizósfera	
EC1	<i>Erato Polymnoides</i>	C	Control	<i>Bacillus</i> sp.
EC2	<i>Erato Polymnoides</i>	C	Control	<i>Bacillus</i> sp.
EC3	<i>Erato Polymnoides</i>	C	Control	<i>Bacillus</i> sp.
EC4	<i>Erato Polymnoides</i>	C	Control	<i>Bacillus</i> sp.
EC5	<i>Erato Polymnoides</i>	C	Control	<i>Bacillus</i> sp.
EC6	<i>Erato Polymnoides</i>	C	Control	<i>Bacillus</i> sp.
EC7	<i>Erato Polymnoides</i>	C	Control	<i>Bacillus</i> sp.
EC8	<i>Erato Polymnoides</i>	C	Control	<i>Bacillus</i> sp.
EC9	<i>Erato Polymnoides</i>	C	Control	<i>Bacillus</i> sp.
EC10	<i>Erato Polymnoides</i>	C	Control	<i>Lysinibacillus</i> sp.
EP1	<i>Erato Polymnoides</i>	A	Contaminado	<i>Lysinibacillus</i> sp.
EP2	<i>Erato Polymnoides</i>	A	Contaminado	<i>Bacillus</i> sp.
EP3	<i>Erato Polymnoides</i>	A	Contaminado	<i>Bacillus</i> sp.
EP4	<i>Erato Polymnoides</i>	A	Contaminado	<i>Bacillus</i> sp.
EP5	<i>Erato Polymnoides</i>	A	Contaminado	<i>Bacillus</i> sp.
EP6	<i>Erato Polymnoides</i>	A	Contaminado	<i>Bacillus</i> sp.
EP7	<i>Erato Polymnoides</i>	A	Contaminado	<i>Bacillus</i> sp.
MC1	<i>Miconia zamorensis</i>	C	Control	<i>Bacillus</i> sp.
MC2	<i>Miconia zamorensis</i>	C	Control	<i>Bacillus</i> sp.
MC3	<i>Miconia zamorensis</i>	C	Control	<i>Serratia</i> sp.
MC4	<i>Miconia zamorensis</i>	C	Control	<i>Bacillus</i> sp.
MC5	<i>Miconia zamorensis</i>	C	Control	<i>Bacillus</i> sp.
MP1	<i>Miconia zamorensis</i>	A	Contaminado	<i>Serratia</i> sp.
MP2	<i>Miconia zamorensis</i>	A	Contaminado	<i>Serratia</i> sp.
MP3	<i>Miconia zamorensis</i>	A	Contaminado	<i>Serratia</i> sp.
MP4	<i>Miconia zamorensis</i>	A	Contaminado	<i>Bacillus</i> sp.
MP5	<i>Miconia zamorensis</i>	A	Contaminado	<i>Bacillus</i> sp.

\* Ver identificación filogenética en la Figura 1.

Tabla 1: Identificación molecular de aislados bacterianos.

### Análisis filogenético de Bacterias.

La Figura 1 revela un árbol filogenético entre las cepas aisladas y las secuencias de varias especies de referencia del GenBank. Lo que ha permitido conocer las poblaciones de bacterias cultivables pertenecientes a las diferentes fuentes de aislamiento.

Se ha evidenciado la presencia de los géneros *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Serratia* en los transectos A y C. Tal patrón de agregación se puede explicar porque que ambos transectos se encuentran en un área con un alto deterioro del medio ambiente. El transecto C pertenece a una zona minera abandonada, donde las actividades mineras se detuvieron cinco años antes del presente estudio. Por otro lado el transecto A es una zona intensiva de minería, en donde se están llevando a cabo una gran cantidad de actividades de minería de oro a pequeña escala. Otro de los motivos es que se determinó que en los tejidos (raíz, tallo y hojas) de *Miconia Zamorensis* y *Erato polymnoides* se encontraban considerables cantidad de Hg. En el transecto C una media de concentración de Hg de  $(0.4 \pm 0.2 - \text{mg kg}^{-1})$ , mientras que en el transecto A una media de concentración de Hg de  $(2.1 \pm 1.8 - \text{mg kg}^{-1})$ . Por lo tanto no existe gran diferencia en la concentración de Hg entre los transectos, lo que evidencia las similares condiciones de contaminación entre ambos sitios.

Es interesante indicar que los géneros dominantes detectados en las muestras de cada transecto se relacionan con cepas degradantes y resistentes a metales pesados, tales como *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Serratia*.<sup>22</sup> informaron que *Bacillus* es una cepa bacteriana de amplia resistencia al mercurio (Hg), entre las principales condiciones que permite tal resistencia se encuentra la esporulación, que es de carácter natural para favorecer el cre-

Fuente de aislamiento				
Aislado	Especie vegetal	Transecto	Tipo de suelo de rizósfera	Identificación filogenética *
EC1	<i>Erato Polymoides</i>	C	Control	<i>Mucor</i> sp.
EC2	<i>Erato Polymoides</i>	C	Control	<i>Trichoderma</i> cf. <i>Harzianum</i>
EC3	<i>Erato Polymoides</i>	C	Control	<i>Trichoderma</i> sp2
EC4	<i>Erato Polymoides</i>	C	Control	<i>Nodulisporium</i> sp.
EC5	<i>Erato Polymoides</i>	C	Control	<i>Fusarium</i> cf. <i>Oxysporum</i>
EC6	<i>Erato Polymoides</i>	C	Control	<i>Fusarium</i> cf. <i>Oxysporum</i>
EC7	<i>Erato Polymoides</i>	C	Control	<i>Mucor</i> sp.
EC8	<i>Erato Polymoides</i>	C	Control	<i>Mucor</i> sp.
EC9	<i>Erato Polymoides</i>	C	Control	<i>Mucor</i> sp.
EC10	<i>Erato Polymoides</i>	C	Control	<i>Aspergillus</i> cf. <i>Niger</i>
EC11	<i>Erato Polymoides</i>	C	Control	<i>Fusarium</i> cf. <i>Oxysporum</i>
EC12	<i>Erato Polymoides</i>	C	Control	<i>Trichoderma</i> sp1
EP1	<i>Erato Polymoides</i>	A	Contaminado	<i>Mucor</i> sp.
EP3	<i>Erato Polymoides</i>	A	Contaminado	<i>Mucor</i> cf. <i>Irregularis</i>
EP4	<i>Erato Polymoides</i>	A	Contaminado	<i>Trichoderma</i> cf. <i>Harzianum</i>
EP5	<i>Erato Polymoides</i>	A	Contaminado	<i>Trichoderma</i> cf. <i>Longibrachiatum</i>
EP6	<i>Erato Polymoides</i>	A	Contaminado	<i>Trichoderma</i> cf. <i>Harzianum</i>
EP7	<i>Erato Polymoides</i>	A	Contaminado	<i>Trichoderma</i> sp2
EP8	<i>Erato Polymoides</i>	A	Contaminado	<i>Trichoderma</i> cf. <i>Harzianum</i>
EP9	<i>Erato Polymoides</i>	A	Contaminado	<i>Trichoderma</i> cf. <i>Harzianum</i>
EP10	<i>Erato Polymoides</i>	A	Contaminado	<i>Mucor</i> sp.
EP11	<i>Erato Polymoides</i>	A	Contaminado	<i>Mucor</i> sp.
EP12	<i>Erato Polymoides</i>	A	Contaminado	<i>Mucor</i> sp.
MC1	<i>Miconia zamorensis</i>	C	Control	<i>Umbelopsis</i> sp.
MC2	<i>Miconia zamorensis</i>	C	Control	<i>Hypocnium</i> sp.
MC3	<i>Miconia zamorensis</i>	C	Control	<i>Aspergillus</i> cf. <i>Niger</i>
MC4	<i>Miconia zamorensis</i>	C	Control	<i>Aspergillus</i> cf. <i>Niger</i>
MC5	<i>Miconia zamorensis</i>	C	Control	<i>Rhizopus</i> cf. <i>Oryzae</i>
MC6	<i>Miconia zamorensis</i>	C	Control	<i>Talaromyces</i> cf. <i>Purpureogenus</i>
MC7	<i>Miconia zamorensis</i>	C	Control	<i>Aspergillus</i> cf. <i>Flavus</i>
MC8	<i>Miconia zamorensis</i>	C	Control	<i>Trichoderma</i> cf. <i>Longibrachiatum</i>
MC9	<i>Miconia zamorensis</i>	C	Control	<i>Aspergillus</i> cf. <i>Fumigatus</i>
MC11	<i>Miconia zamorensis</i>	C	Control	<i>Trichoderma</i> cf. <i>Longibrachiatum</i>
MP1	<i>Miconia zamorensis</i>	A	Contaminado	<i>Trichoderma</i> cf. <i>Harzianum</i>
MP2	<i>Miconia zamorensis</i>	A	Contaminado	<i>Trichoderma</i> sp2
MP4	<i>Miconia zamorensis</i>	A	Contaminado	<i>Trichoderma</i> cf. <i>Harzianum</i>
MP6	<i>Miconia zamorensis</i>	A	Contaminado	<i>Aspergillus</i> cf. <i>Terreus</i>
MP9	<i>Miconia zamorensis</i>	A	Contaminado	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>
MP10	<i>Miconia zamorensis</i>	A	Contaminado	<i>Aspergillus</i> cf. <i>Terreus</i>
MP11	<i>Miconia zamorensis</i>	A	Contaminado	<i>Aspergillus</i> cf. <i>Flavus</i>
MP12	<i>Miconia zamorensis</i>	A	Contaminado	<i>Trichoderma</i> sp2

\* Ver identificación filogenética en la Figura 2.

**Tabla 2:** Identificación molecular de aislados fúngicos.

cimiento de *Bacillus* bajo condiciones de estrés. Además<sup>23</sup> indicaron que bacterias formadoras de esporas resistentes a metales pesados como *Bacillus* pueden emplearse en sitios contaminados que permitan la biorremediación de ambientes tóxicos.

Las cepas del género *Lysinibacillus* es ampliamente aplicada en la biorremediación de metales pesados<sup>24</sup>, tales como Co, Cu, Cr y Pb<sup>25</sup>. Otra de las cepas bacterianas identificadas pertenecen al género *Serratia* la cual ha sido identificada de naturaleza tolerante a metales<sup>26</sup>. En un estudio realizado por<sup>27</sup> reportaron que *Serratia* posee un amplio rango de resistencia a múltiples metales pesados como Mn, Hg, Pb, Zn, Cr, Ni, Co.

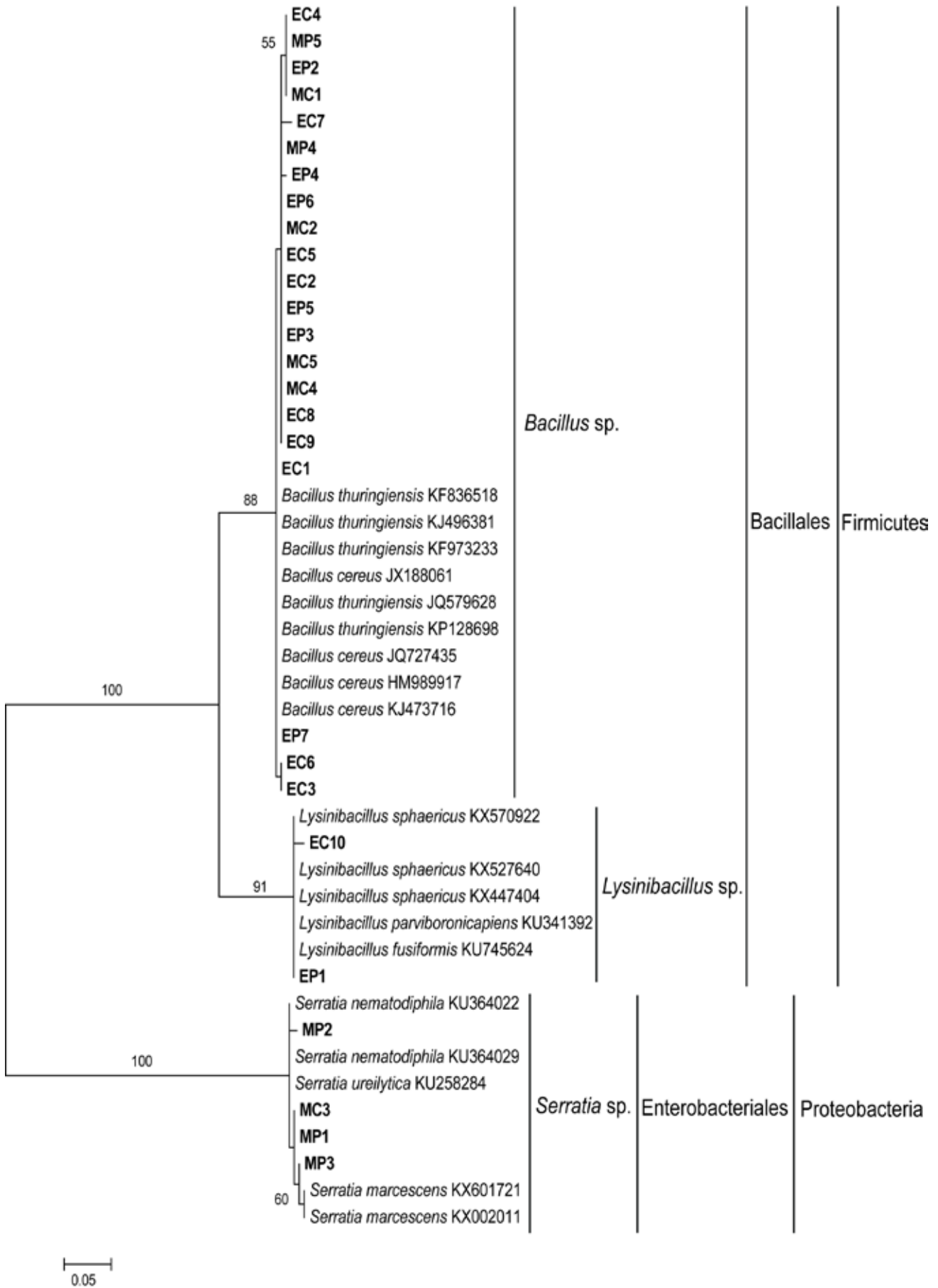
### Análisis filogenético de Hongos.

En la Figura 2 se muestra un árbol filogenético de las muestras fúngicas y las secuencias de varias especies de referencia del GenBank. Lo que ha permitido conocer las poblaciones de

hongos cultivables pertenecientes a las diferentes fuentes de aislamiento.

En los transectos A y C se ha evidenciado que las concentraciones de Hg en el suelo se encuentran en cantidades significativas, por ello la mayoría de los géneros identificados en el presente estudio se encuentran tanto en los transectos A y C.

Los hongos son habitantes naturales del suelo y tienen una elevada potencialidad para la remediación en virtud de su enorme crecimiento, mayor biomasa, producción y extenso alcance de las hifas en el suelo<sup>28</sup>. Son un grupo versátil, ya que pueden adaptarse y crecer en diversas condiciones extremas de pH, temperatura y disponibilidad de nutrientes, así como en ambientes con elevadas concentraciones de metales<sup>29</sup>, como es el caso del área minera de Chinapintza, zona de la cual se aisló los hongos cultivables del suelo. Por otro lado ofrecen la ventaja de contener



**Figura 1:** Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud basado en la región 16S parcial de ARN ribosomal que muestra las relaciones filogenéticas de muestras bacterianas de los Transectos A y C. Solamente se muestran los valores de bootstrap superiores a 50%.



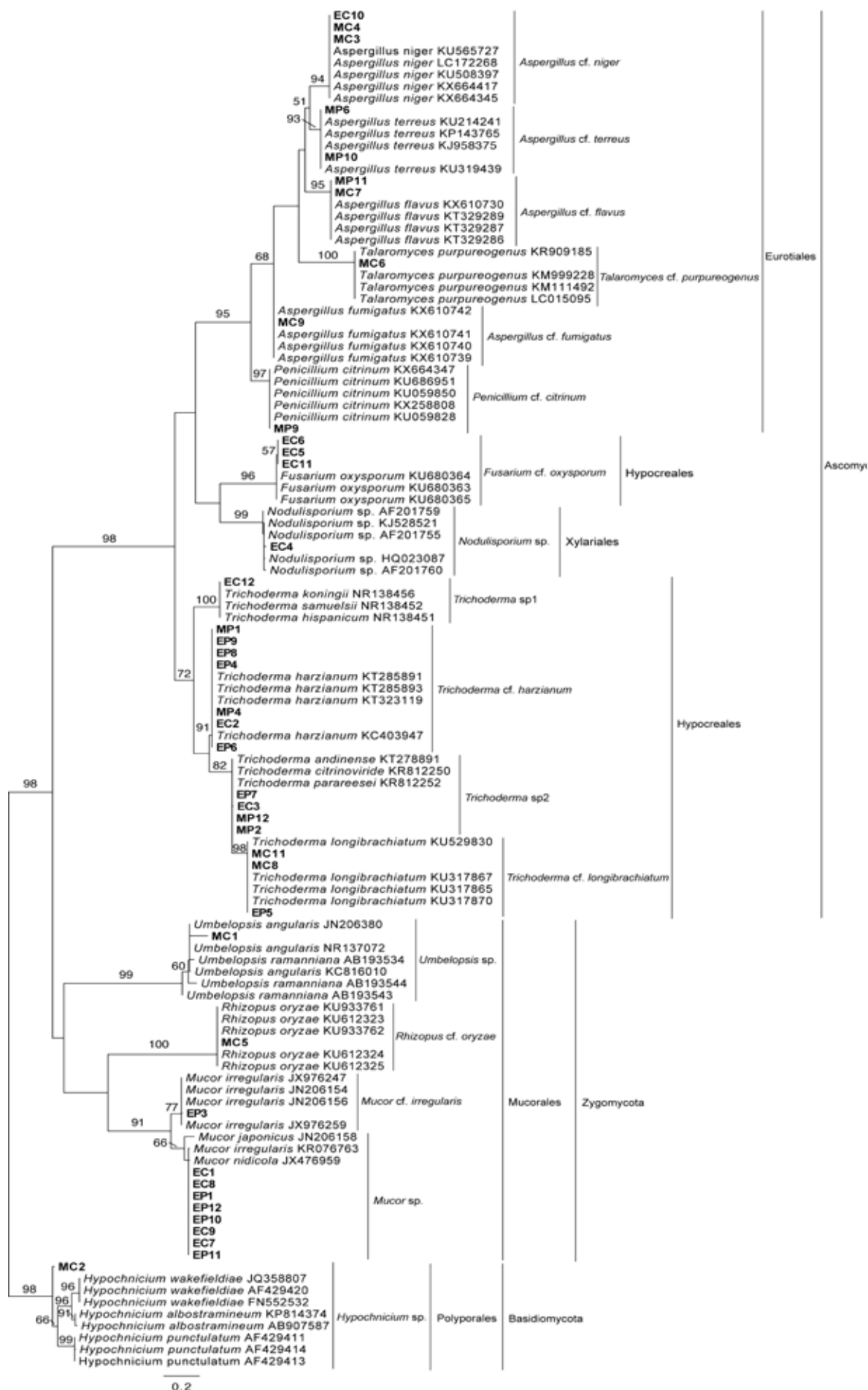


Figura 2: Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud basado en la región ITS1 de ARN ribosomal que muestra las relaciones filogenéticas de muestras fúngicas de los Transectos A y C. Solamente se muestran los valores de bootstrap superiores a 50%.

material en la pared celular que muestra excelentes propiedades de unión a los metales<sup>30</sup>. Al describir la capacidad de crecer en altas concentraciones de metales, distinguimos hongos tolerantes a metales pesados los cuales se describen a continuación.

Especies del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Trichoderma* son únicos por su elevada tolerancia a metales y por su potencial de biosorción a diferentes metales pesados, además pertenecen a los microorganismos que son muy eficaces en la eliminación de metales pesados de ambientes contaminados<sup>31</sup>. Por ello se han convertido en microorganismos dominantes en hábitats contaminados<sup>32</sup>.

Otro de los géneros identificados fue *Talaromyces* el cual es tolerante a elevados niveles de Hg, Cu, Co, Pb y Cd<sup>33</sup>. La adaptación a dichos metales fue el resultado de mecanismos fisiológicos y por procesos bioquímicos activados que confieren resistencia a varios metales pesados<sup>34</sup>. También entre los géneros identificados se encuentran *Nodulisporium* el cual es un hongo endófito<sup>35</sup> y es eficaz como agente de control biológico contra una variedad de hongos patógenos<sup>36</sup>; *Mucor* que ha sido aislado de suelos contaminados por metales pesados y se ha descrito una fuerte resistencia a Cd y Pb<sup>37</sup>; *Umbelopsis* que es tolerante a elevadas concentraciones de Hg<sup>38</sup> e *Hypochnicium* que posee una elevada resistencia a Hg, As, Cd, Cu y Pb respectivamente<sup>39</sup>. Finalmente entre los aislados se encontraron muestras pertenecientes al género *Fusarium* el cual puede desarrollarse en ambientes con presencia de Cr<sup>40</sup>.

## CONCLUSIONES

El presente estudio representa un primer avance en el conocimiento de la microflora asociada a la rizósfera de las especies identificadas como acumuladoras, *Miconia zamorensis* y *Erato polymnoides* en la zona minera de Chinapintza. Se pudo obtener un alto nivel de diversidad con respecto a los géneros y especies de hongos y bacterias identificados, que serán el punto de partida de información sobre la potencialidad que brindan estos microorganismos para desarrollar estrategias de biorremediación en la zona de estudio. Se determinó la presencia de géneros bacterianos que pueden emplearse como agentes potenciales de biorremediación. Tales géneros bacterianos pueden tolerar ambientes contaminados con metales pesados debido a que poseen varias características metabólicas y catabólicas de resistencia. Por otro lado el conocimiento de la presente investigación proporcionará información acerca de los principales géneros fúngicos que se encuentran en la rizósfera de especies vegetales acumuladoras de metales pesados en Chinapintza, y con ello se pretenderá conocer acerca de la enorme diversidad de hongos que existe en el suelo.

La disponibilidad de materiales biológicos proporciona una ventaja significativa para establecer metodologías que permitan almacenar y preservar de forma estable durante determinados periodos de tiempo microorganismos basados en experimentación in vitro, y con ello apoyar programas de conservación, remediación de áreas contaminadas o el desarrollo de técnicas de preservación eficientes. La congelación a -80°C de las muestras microbianas con la metodología establecida en el estudio permitió el mantenimiento de la actividad enzimática y metabólica al cabo de un periodo de almacenamiento. Por lo tanto el método aplicado en la criopreservación de bacterias y hongos permitió obtener una viabilidad efectiva en la reactivación de las cepas puras.

## AGRADECIMIENTOS

Con inmenso placer me gustaría dejar constancia de mi sincero agradecimiento al PhD. Aminaél Sánchez, por su orientación, observaciones, críticas y estímulo durante el transcurso de este trabajo. También tengo una gratitud especial al Bq. Oscar Vivanco por su colaboración y las intervenciones oportunas en momentos cruciales. Expreso un profundo agradecimiento al

Ing. Hernán Lucero por todos sus comentarios de apoyo y de motivación que extendió hacia mí durante el curso de la investigación. Finalmente a mi amiga y compañera Blga. Xiomara Recalde por su colaboración.

## Referencias bibliográficas

- Lovitz S. B. Scales of responsible gold mining: overcoming barriers to cleaner artisanal mining in southern Ecuador [Doctoral dissertation]. The University of Vermont; 2006.
- Report I. Soil Contamination : Impacts on Human Health. Science for Environmental Policy. 2013; (5):1-29.
- Dixit R, Wasiullah E, Malaviya D, Pandiyan K, Singh U, Sahu A, Shukla R & Paul, D. Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. Sustainability. 2015;7(2):2189-2212.
- González Chávez M del C. Remediation of Soils Polluted with Heavy Metal Using Plants and Rhizospheric Microorganisms. Terra Latinoamericana. 2005;23(1):29-37.
- Lambers H, Mougél C, Jaillard B, Hinsinger P. Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. Plant and Soil. 2009;321(1-2):83-115.
- Ortiz-Castro R, Contreras-Cornejo H, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J. The role of microbial signals in plant growth and development. Plant Signaling & Behavior. 2009;4(8):701-12.
- Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers J. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. FEMS microbiology reviews. 2013;37(5):634-663.
- Wang Y, Shi J, Wang H, Lin Q, Chen X, Chen Y. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2007;67(1):75-81.
- Turpeinen R. Interactions between metals, microbes and plants – Bioremediation of arsenic and lead contaminated soils. 1st ed. Lahti: University of Helsinki; 2002. 48.
- Sobolev D, Begonia M. Effects of heavy metal contamination upon soil microbes: Lead-induced changes in general and denitrifying microbial communities as evidenced by molecular markers. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2008;5(5):450-456.
- Hongbo S, Liye C, Gang X, Kun Y, Lihua Z, Junna S. Progress in Phytoremediating Heavy-Metal Contaminated Soils. Detoxification of Heavy Metals. 2011. p. 73-90.
- Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R, Jackson RB. Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. Applied and environmental microbiology. 2005;71(7):4117-20.
- Vekeman B, Hoefman S, De Vos P, Spieck E, Heylen K. A generally applicable cryopreservation method for nitrite-oxidizing bacteria. Systematic and Applied Microbiology. 2013;36(8):579-84.
- Day J, Stacey G. Cryopreservation and freeze-drying protocols. 2da ed. Methods in molecular biology. Humana Press; 2007. 347 p.
- Criste A, Giuburuncă M, Negrea O, Dan S, Marius Z. Research Concerning Use of Long-Term Preservation Techniques for Microorganisms. Animal Science and Biotechnologies. 2014;47(2):73-78.
- Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology. 2003;46(3):205-29.
- Le Bui T. Cryopreservation, culture recovery and glucose induced programmed cell death in chlorophyte microalgae [Doctoral dissertation]. The University of Queensland; 2015.
- Day J. Cryopreservation: Fundamentals, mechanisms of damage on freezing/thawing and application in culture collections. Nova Hedwigia. 2004;79(1-2):191-205.
- Homolka L. Methods of Cryopreservation in Fungi. Laboratory Protocols in Fungal Biology. 2013;9-17.
- Espinell-Ingroff A, Montero D, Martín-Mazuelos E. Long-Term Preservation of Fungal Isolates in Commercially Prepared Cryogenic Microbank Vials. Journal of Clinical Microbiology. 2004;42(3):1257-1259.
- Lorv J, Rose D, Glick B. Bacterial Ice Crystal Controlling Proteins. Scientifica. 2014;2014:1-20.

22. Khare S, Ahmed N, Pant S, Das R. Characterization and evaluation of heavy metal tolerance of bacterial species from soil of waste area near Riyan steel rolling mills, Muzaffarnagar, India. *Journal of Applied Natural Science*. 2010;2:88-92.
23. Kumar A, Singh Bisht B, Datt Joshi V. Biosorption of Heavy Metals by four acclimated microbial species, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. and *Aspergillus niger*. *Journal of Biological and Environmental Sciences*. 2010;4(12):97-108
24. Peña-Montenegro T, Dussán J. Genome sequence and description of the heavy metal tolerant bacterium *Lysinibacillus sphaericus* strain OT4b.31. *Standards in Genomic Sciences*. 2013;9(1):42-56.
25. Tuzen M, Dogan O, Usta C, Soylak M. Biosorption of copper ( II ), lead ( II ), iron ( III ) and cobalt ( II ) on *Bacillus sphaericus* -loaded Diaion SP-850 resin. *Analytica Chimica Acta*. 2007; 581(2):241-246.
26. Nageswaran N, Ramteke P, Verma O, Pandey A. Antibiotic Susceptibility and Heavy Metal Tolerance Pattern of *Serratia Marcescens* Isolated From Soil and Water. *Biorremediation & Biodegradation*. 2012;3(7):3-7.
27. Jafarzade M, Mohamad S, Usup G, Ahmad A. Heavy-metal tolerance and antibiotic susceptibility of red pigmented bacteria isolated from marine environment. *Natural Resources*. 2012;3(4):171-174.
28. Siddiquee S, Rovina K, Azad S, Naher L, Suryani S, Chaikaew P. Microbial & Biochemical technology heavy metal contaminants removal from wastewater using the potential filamentous fungi biomass : A Review. *Microbial & Biochemical Technology*. 2015;7(6):384-393.
29. Iram S, Zaman A, Iqbal Z, Shabbir R. Heavy metal tolerance of fungus isolated from soil contaminated with sewage and industrial wastewater. *Pol J Environ Stud*. 2013;22(3):691-697.
30. Khan A, Sharif M, Ali A, Noor S, Shah M, Mian I, & Ali, N. Potential of AM fungi in phytoremediation of heavy metals and effect on yield of wheat crop. *American Journal of Plant Sciences*. 2014;1578-1586.
31. Petková K, Jurkovic L, Simonovicova A, Cernansky S. Potential of *Aspergillus niger* in bioremediation of contaminated soils. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM: Surveying Geology & Mining Ecology Management*. 2013;1:757-762.
32. Iram S, Perveen K, Shuja N, Waqar K, Akhtar I, Ahmad I. Tolerance potential of different Species of *Aspergillus* as bioremediation tool - Comparative analysis. *Journal of Microbiology*. 2013;1(1):1-8.
33. Jaitly A. Mycoremediation : utilization of fungi for reclamation of heavy metals at their optimum remediation conditions. *Biolife*. 2015;3(1):77-106
34. Romero M, Reinoso E, Urrutia M, Kiernan A. Biosorption of heavy metals by *Talaromyces helicus*: A trained fungus for copper and biphenyl detoxification. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2006;9(3):221-226.
35. Nair D, Padmavathy S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *The Scientific World Journal*. 2014;2014:11.
36. Porras-Alfaro A, Bayman P. Hidden Fungi , Emergent Properties : Endophytes and Microbiomes. *Phytopathology*. 2011;49(1):291.
37. Zhu S, Tang J, Zeng X, Wei B, Yang S, Huang B. Isolation of *Mucor circinelloides* Z4 and *Mucor racemosus* Z8 from heavy metal-contaminated soil and their potential in promoting phytoextraction with Guizhou oilseed rap. *Journal of Central South University*. 2015;22(1):88-94.
38. Crane S. Mercury effects on axenically grown fungal isolates and on pinus rigida and its ectomycorrhizal community [Doctoral dissertation]. The State University of New Jersey; 2011.
39. Kim M, Kim J, Kim G. Metal tolerance and sorption potential of indigenous basidiomycetous fungi. *Division of Environmental Science & Ecological Engineering*. 2011;88-89.
40. Khurshid S, Shoaib A, Javaid A, Abid K. Bioaccumulation of chromium by *Fusarium oxysporum*. *ScienceAsia*. 2016; 42(2):92-98.

**Recibido:** 10 de abril de 2017

**Aprobado:** 15 de mayo de 2017



PARA  
INVESTIGADORES

PARA  
ORGANIZACIONES

QUIÉNES  
SOMOS

AYUDA

## DISTÍNGASE EN TRES SENCILLOS PASOS

ORCID proporciona un identificador digital persistente que lo distingue a usted de todos los otros investigadores y, por medio de la integración en flujos de trabajo de investigación clave, como presentación de manuscritos y subvenciones, acepta enlaces automatizados entre usted y sus actividades profesionales, garantizando que su trabajo sea reconocido.



REGÍSTRESE

Obtenga su identificador único ORCID ¡Regístrese ahora!

Registrarse lleva 30 segundos.

<https://orcid.org/>

## INVESTIGACIÓN

## Germinación y crecimiento inicial de plántulas de Guaijí (*Couepia subcordata*) bajo condiciones de vivero

### Germination and initial growth of Guaijí (*Couepia subcordata*) seedlings under nursery conditions

Jaime Naranjo Morán, Eduardo Chica Martínez

DOI. 10.21931/RB/2017.02.02.4

## RESUMEN

*Couepia subcordata* (Chrysobalanaceae) es una especie forestal que crece silvestre tanto en la costa como en la Amazonía ecuatoriana. Sin embargo, su población ha ido reduciéndose debido a la expansión agrícola. El árbol produce un fruto de drupa pulposa y rica en carotenos, consumida aún por la población en el campo, no obstante, se desconoce los principales parámetros agronómicos que permitan su reproducción y conservación. El objetivo de este trabajo fue evaluar la germinación y crecimiento inicial de las plántulas luego de la aplicación de los siguientes tratamientos: escarificación, despulpado e inmersión de semillas por 48 horas en ácido giberélico. En todos los tratamientos se registró similar número de semillas germinadas, no obstante, la germinación fue más rápida en el tratamiento de escarificación y de imbibición en solución de ácido giberélico. Las plantas de dos meses de edad alcanzaron una altura de ~8.82 cm y 0.3 cm de diámetro, además tuvieron tres hojas verdaderas, indicando que el desarrollo en vivero de esta especie podría ser rápido.

**Palabras clave:** *Guaijí*, *Chrysobalanaceae*, establecimiento, recuperación.

## ABSTRACT

*Couepia subcordata* (Chrysobalanaceae) is a forest species that grows wild both on the coast and in the Ecuadorian Amazon. However, its population has been reduced by agricultural expansion. The tree produces a drupe whose pulp is rich in carotenoids, still consumed by the population in the field, however the main agronomic parameters to reproduce and preserve the species are unknown. The objective of this work was to estimate germination and seedling initial growth after the application of the following treatments: scarification, pulp removal and immersion in gibberellic acid solution. In all treatments, a similar number of germinated seeds were recorded, however germination was faster in the treatment of the emulsion in the gibberellic acid solution. Two-months old plants were 8.82 cm tall, had ~0.3 cm stem diameters and 3 fully expanded leaves, suggesting that nursery development for this species is fast.

**Keywords:** *Guaijí*, *Chrysobalanaceae*, created, recovery.

## Introducción

El Guaijí (*Couepia subcordata* Benth.) es un árbol de la familia Chrysobalanaceae<sup>1</sup>, es una especie nativa de América del sur y está distribuida en toda la cuenca Amazónica<sup>2</sup>. En Ecuador crece en la región Costa y Amazónica<sup>3</sup>. En la costa es evidencia tangible de la transferencia comercial entre la amazonia y la costa antes de la llegada de los españoles, puesto que se encuentran registros históricos desde la expedición botánica de 1799, realizada por Juan Tafalla<sup>4</sup>. La especie era abundante, arraigada en la cultura indígena lo llamaban “Huayhi”, sin embargo, con la expansión de la colonia española su consumo se redujo y las poblaciones silvestres de esta especie fueron reduciéndose, con el mestizaje, *C. subcordata* fue aprovechada como maderable<sup>5</sup> y como especie acompañante en plantaciones de cacao fino de aroma. Actualmente las poblaciones de *C. subcordata*<sup>6</sup> se mantienen reducidas, debido al

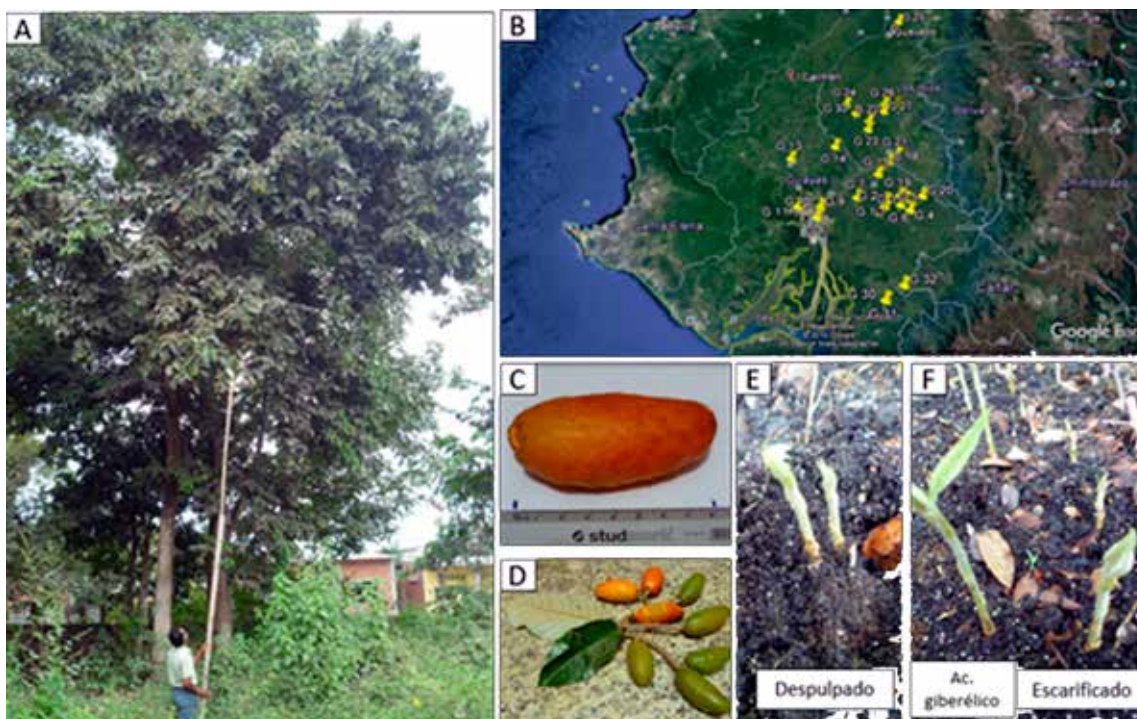
crecimiento de la frontera agrícola de monocultivos y se la encuentra de forma esporádica en las provincias de Manabí, Los Ríos y Guayas en interacción con el pueblo montubio. Las características morfológicas de Guaijí son: hojas elípticas, cordadas, haz de color verde oscuro y envés de color blanco, flores en receptáculo cilíndrico, pubescentes, lóbulos de cáliz agudo, con cinco pétalos blancos, frutos elipsoides de 5 a 9 centímetros de largo, epicarpio suave, mesocarpio carnoso y endocarpio fibroso<sup>7</sup> (Fig. 1)., la especie forma parte del banco de germoplasma de INIAP y la utilizan para reintroducir individuos de zonas perturbadas por la agricultura<sup>8</sup>.

## Métodos

La especie en el litoral fue encontrada en dos nichos ecológicos tales como; bosque seco tropical y bosque húmedo tropical, no se conoce los parámetros

<sup>1</sup> Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador; Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador.

<sup>2</sup> Carrera de Ingeniería Agronómica, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Av. 12 de Octubre y Diego de Tapia, Cuenca, Ecuador.



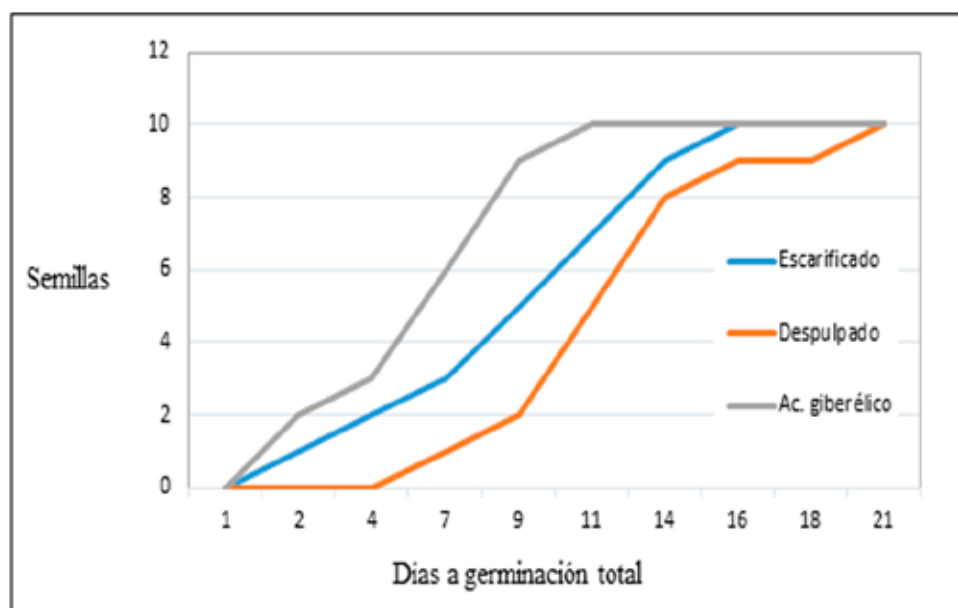
**Figura 1:** *Couepia Subcordata* (Guaijí); A) Árbol elite, B) Remanentes de árboles en Prov. Guayas y Los Ríos, C) Fruto maduro, D) Hojas y Frutos, E y F) Germinación de tratamientos, Fotos tomadas el: 01 de octubre del 2012.

agronómicos para su reproducción o conservación<sup>9</sup>. El objetivo de este trabajo fue evaluar la germinación y crecimiento inicial de las plántulas luego de la aplicación de los siguientes tratamientos: escarificación, despulpado e inmersión de semillas en ácido giberélico. El experimento se llevó a cabo en Escuela Superior Politécnica del litoral (ESPOL) en Guayaquil (Ecuador) durante los meses de octubre, noviembre y diciembre de 2013. Se obtuvieron semillas de características similares de árboles situados en los cantones Milagro y Naranjito. Las semillas colectadas fueron separadas de forma aleatoria en grupos de 10 semillas. Un grupo de semillas fue escarificado y sumergido en agua por 48 horas, otro grupo solo fue despulpado, mientras que el último grupo fue escarificado y sumergido en una solución de ácido giberélico (0.1%) por 48 horas. Luego a estos tratamientos, las semillas fue-

ron sembradas en turba mantenidas a capacidad de campo por la duración del experimento.

## Resultados

La germinación fue de tipo hipogea y se registró un 98% de germinación después de 34 días desde la siembra para todos los tratamientos. No obstante, la germinación fue más rápida en el tratamiento de escarificación e imbibición en solución de ácido giberélico (Fig. 2). Las plántulas de dos meses de edad alcanzaron una altura aproximada de 8.82 cm y 0.3 cm de diámetro y lograron desarrollar tres hojas verdaderas completamente expandidas. En 4 de 10 semillas sembradas para cada tratamiento, se observaron



**Figura 2:** Germinación de semillas de *C. subcordata* bajo tres tratamientos pregerminativos.

poliembriogénesis, registrándose un máximo de 3 embriones germinados por semilla. El alto porcentaje de germinación y rápido desarrollo inicial de las plántulas sugiere que la implementación de programas de reproducción de esta especie no tendrá mayores problemas en producir un alto número de plantas en corto tiempo.

## Conclusiones

No se identificaron limitaciones para la propagación de *C. subcordata* a partir de semillas. El tratamiento de semillas con ácido giberélico redujo aproximadamente en 5 días el tiempo de germinación del lote completo de semillas. El desarrollo en fase vivero de la especie fue rápido, por lo que la propagación de esta especie por semilla es una opción viable para dar soporte a programas orientados a la conservación, re-introducción y aprovechamiento sostenible de la especie.

## Referencias bibliográficas

1. Prance G. T. (2013). Volume 11 of the series The Families and Genera of Vascular Plants pp 19-28, Chrysobalanaceae, DOI: 10.1007/978-3-642-39417-1\_5.
2. Bass, M. S., Finer, M., Jenkins, C. N., Kreft, H., Cisneros-Heredia, D. F., McCracken, S. F., & Di Fiore, A. (2010). Global conservation significance of Ecuador's Yasuní National Park. PLoS one, 5(1), e8767. DOI: 10.1371/journal.pone.0008767
3. Paulino-Neto, H. F. (2007). Pollination and breeding system of *Couepia uiti* (Mart. and Zucc.) Benth (Chrysobalanaceae) in the Pantanal da Nhecolândia, Brazilian Journal of Biology, 67(4), 715-719, Extraído de: <http://www.scielo.br/pdf/bjb/v67n4/17.pdf>.
4. Estrella, E., Nuñez, J., & Lara, J. S. (1991). Flora huayaquilensis: la expedición botánica de Juan Tafalla a la real audiencia de Quito 1799-1808. Abya-Yala, Quito, Extraído de: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGRUCO.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=003249>.
5. Jang, D. S., Park, E. J., Kang, Y. H., Vigo, J. S., Graham, J. G., Cabieses, F., ... & Kinghorn, A. D. (2004). Phenolic compounds obtained from stems of *Couepia ulei* with the potential to induce quinone reductase. Archives of pharmacal research, 27(2), 169-172, DOI: 10.1007/BF02980101
6. Rozo, Y., Quintero, L., Parra, M., Rodríguez, C., & Melgarejo, L. M. (2009). Analysis of genetic variability in *Couepia* accessions using AFLP markers. Genetic resources and crop evolution, 56(1), 77-83, DOI:10.1007/s10722-008-9346-6.
7. Berto, A., Ribeiro, A. B., Sentandreu, E., de Souza, N. E., Mercadante, A. Z., Chisté, R. C., & Fernandes, E. (2015). The seed of the Amazonian fruit *Couepia bracteosa* exhibits higher scavenging capacity against ROS and RNS than its shell and pulp extracts. Food & function, 6(9), 3081-3090, DOI: 10.1039/C5FO00722D.
8. GADPO (2015). Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la Provincia de Orellana 2015-2019. Francisco de Orellana - Ecuador, [http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL\\_SNI/data\\_sigad\\_plus/sigadplusdocumentofinal/1560002480001\\_PDYOT%202015-2019\\_ORELLANA\\_ACTUALIZADO\\_17-08-2015\\_18-20-50.pdf](http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdocumentofinal/1560002480001_PDYOT%202015-2019_ORELLANA_ACTUALIZADO_17-08-2015_18-20-50.pdf)
9. Cerón M, C. E.; Montalvo A, C. G. (1998). Etnobotánica de los Huorani de Quehueiri-ono Napo, Ecuador. Universidad Central del Ecuador, Escuela de Biología, Quito, Ecuador, Extraído de: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20016784985>

Recibido: 14 de febrero de 2017

Aprobado: 20 de mayo de 2017

# SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOALS



Revista Bionatura supports the Sustainable Development Goals

## INVESTIGACIÓN

## Evaluation of two-different affinity chromatographic columns based on Protein A for the purification of an IgG2a monoclonal antibody from ascites.

Evaluación de dos columnas cromatográficas de afinidad diferentes basadas en la Proteína A para la purificación de un anticuerpo monoclonal IgG2a de ascitis.

Oscar Otero Alfaro<sup>1</sup>, Fidel Ramírez Bencomo<sup>1</sup>, Elizabeth González Aznar<sup>1</sup>, Rosabel Falcón<sup>2</sup>, Reinaldo Acevedo<sup>1</sup>

DOI. 10.21931/RB/2017.02.02.5

## ABSTRACT

Purification of monoclonal antibodies (MAbs) is today a routine procedure in laboratories destined for obtaining these molecules. Several approaches, based mainly on differential solubility and chromatographic methods, are frequently used for reaching the purity required of these products. For IgG MAbs, affinity chromatography using immobilized protein A or G, is frequently the best option to perform a purification protocol in a single step. In our laboratory, the purification of MAbs like 7E1F7 (IgG2a) against capsular polysaccharide from *Neisseria meningitidis* serogroup A, are usually done by affinity chromatography on Protein G. The objective of this work was to evaluate the feasibility to use two-different affinity chromatographic columns based on Protein A (HiTrap from GE and CIM-A from BIA Separations), for the purification of this MAb. The same purification protocol was followed with both columns. Percentage of recovery, purity and immunoreactivity of the purified MAb were calculated and used to compare the performance of both columns. Similar chromatographic profiles were obtained from both columns. However, for CIM-A column, protein concentration and total recovery were significantly higher ( $p < 0.0001$ ). Purity levels of the 7E1F7 MAb over 95% was obtained with both columns without any change on its immunoreactivity. The use of Protein A coupled to monolith supports, like from BIA Separations Company, offers an attractive possibility to purify MAbs from ascites with high recovery, purity levels and fully preserved reactivity. This paper constitutes the first report on the use of monolithic columns in the purification of monoclonal antibodies from ascites.

**Keywords:** Monoclonal Antibodies, Ascites, Protein A, Particle Bed, Monolith, and Affinity Chromatography.

## RESUMEN

La purificación de anticuerpos monoclonales (MAb) es hoy un procedimiento de rutina en laboratorios destinados a la obtención de estas moléculas. Para alcanzar la pureza requerida de estos productos se utilizan frecuentemente diversos enfoques, principalmente basados en el diferencial de solubilidad y en métodos cromatográficos. Para los MAbs de tipo IgG, la cromatografía de afinidad utilizando la proteína A o G inmovilizada, es frecuentemente la mejor opción para realizar un protocolo de purificación en un solo paso. En nuestro laboratorio, la purificación de MAbs como el 7E1F7 (IgG2a) específico a polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo A se realiza habitualmente por cromatografía de afinidad utilizando proteína G. El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad de utilizar dos columnas cromatográficas diferentes de afinidad basadas en Proteína A (HiTrap de GE y CIM-A de BIA Separations), para la purificación de este MAb. Se siguió el mismo protocolo de purificación con ambas columnas. Se calculó el porcentaje de recuperación, pureza e inmunoreactividad del MAb purificado para comparar el rendimiento de ambas columnas. Se obtuvieron perfiles cromatográficos similares de ambas columnas. Sin embargo, para la columna CIM-A, la concentración de proteínas y la recuperación total fueron significativamente mayores ( $p < 0,0001$ ). Se obtuvieron altos niveles de pureza del MAb 7E1F7, superiores al 95% con ambas columnas, sin ningún cambio en su inmunoreactividad. El uso de Proteína A acoplada a soportes monolíticos, como los de BIA Separations, ofrece una posibilidad atractiva para purificar MAbs de ascitis con alta recuperación, niveles de pureza y reactividad totalmente preservada. Este documento constituye el primer informe sobre el uso de columnas monolíticas en la purificación de anticuerpos monoclonales a partir de líquido ascítico.

**Palabras claves:** Anticuerpos Monoclonales, Líquido Ascítico, Proteína A, Lecho de partículas, Monolito y Cromatografía de Afinidad

## Introducción

The diversity of the antibody-antigen interaction and the possibility to manipulate its characteristics, have created many uses for antibodies and antibody fragments, both for immunochemical techniques within general research and for therapeutic and diagnostic applications. A new age was born for the science,

when Kohler and Milstein<sup>1</sup> described the obtaining of monoclonal antibodies (MAbs) by mean of cellular fusion. Since then, different methods have been developed to purify these molecules. Proceedings based on the principle of differential solubility like: salting out (ammonium or sodium sulfate), caprylic acid or solvent addition, among others, are still used for isolation of fractions containing antibodies. These protocols are

<sup>1</sup> Monoclonal Antibodies Laboratory, Department of Biological Evaluation, Research Area, Institute of Vaccines Finlay. Havana, Cuba,

<sup>2</sup> Department of Microbiology, IPK, Havana, Cuba

Correspondence: framirez@finlay.edu.cu

suitable for bulk proteins and when high purity is not necessary. Chromatographic methods based on anion or cation exchange, hydrophobic interaction, affinity and multi-step-strategies are usually used for reaching purer products<sup>2,3</sup>.

Many of generated MABs belong to IgG class and in this regard, affinity chromatography using immobilized protein A is the most applied affinity system for the purification of antibodies in a single step<sup>4</sup>. Different supports have been used for covalent coupling, either Protein A, G or both<sup>4,7</sup>. During more than 40 years, particulate chromatographic supports (beads) have been widely applied in affinity chromatography<sup>8,9</sup>. Chromatographic monoliths have arisen as an alternative stationary phase having some distinct advantages over beads, which could be summarized as:

- Very high porosity
- High binding capacity for extremely large molecules
- Mass transport based on convection<sup>10</sup>

Chromatographic monoliths can bear any chemical functionality and as such, they can be implemented for various analysis or purifications, one of them being protein A-based chromatography<sup>11,12</sup>.

Our work team previously obtained an IgG2a MAB named 7E1F7 against the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A (CPA)<sup>13</sup>. The purification of this MAB from ascites, was carried out by affinity chromatography on HiTrap Protein G (GE Healthcare, USA) according to the manufacturer's procedure. Several analytical assays, using purified 7E1F7 MAB, such as identity test by indirect ELISA and quantitation of CPA by Sandwich ELISA have been employed<sup>13,14</sup>.

In this report, we compared two-different affinity chromatography columns based on Protein A for the 7E1F7 MAB purification from ascites, in order to explore new methodologies that improves total recovery of the process. The columns: HiTrap rProtein A FF (1 mL) from GE (USA) and CIM r-Protein A-1 (1 mL) from BIA Separations (Slovenia), were evaluated at the same chromatographic conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### Affinity Columns:

-HiTrap rProtein A FF (1ml) from GE, USA (HiTrap A), product code 17-5079-02. Support based on particle media Sepharose Fast Flow.

-CIM r-Protein A-1 (1 mL) monolithic chromatographic support from BIA Separations, Slovenia (CIM A), and product code 317.1004.

### Other reagents:

-Capsular polysaccharide from *Neisseria meningitidis* serogroup A (CPA): MenA PACI lot [2]/10 provided by the Department of Reference Materials of "Finlay Institute", Cuba.

-Ascites containing the 7E1F7 MAB (IgG2a subclass) provided by Monoclonal Antibody Laboratory, "Finlay Institute", Cuba.

All chemical reagents and anti-mouse IgG/HRP conjugated were purchased from Sigma, USA.

### Sample preparation

Six milliliters of ascites containing the 7E1F7 MAB (IgG2a subclass) were two-fold diluted in phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS) to a final volume of 12 mL. The sample was clarified using a MiniSart 0.2 µm filter (Sartorius AG, Germany) and divided into two aliquots of 6 mL each.

## Purification of 7E1F7 MAB by affinity chromatography using two different columns

Chromatographic experiments were performed using AKTA FPLC System and UNICORN software version 3.0 (GE, USA) for data acquirement. The same experimental procedure was followed for both affinity columns. The flow rate applied in all steps was 1mL/min. Previous column equilibration with 10 mL of PBS, an aliquot of 6 mL was loaded into a Superloop and was injected in three individual runs of 2 mL each. After washing with 10 mL of PBS, the unbound fraction (U.F) was collected from the peak start to the end. Desorption of the specific fraction (S.F) containing the MAB, was carried out by acid elution with 10 mL of 0.1 mol/L citric acid solution, pH 5.0 adjusted with sodium hydroxide. The S.F was collected like above and neutralized with Tris 1mol/L, pH 8.0. The elution volume of each fraction was recorded. Regeneration step after each purification cycle was carried out by flushing 10 mL of 0.1 mol/L citric acid solution adjusted to pH 3.0, followed by immediately re-equilibration of the columns with PBS pH 7.4.

## Estimation of total recovery

Total protein concentration in S.F from each run was quantified by the bicinchoninic acid reaction<sup>15</sup> using the Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit from Sigma, USA and Bovine Serum Albumin (BSA) as standard. Each sample was assayed in triplicate with appropriated dilutions for fixing to the standard curve. Total recovery of purified 7E1F7 MAB from each run, was estimated and expressed as milligrams of MAB per milliliter of ascites.

## Analysis of the fractions by SDS-PAGE

From both chromatographic experiments, ascites (1:20), U.F (1:10) and S.F (5 µg/lane) were analyzed on a 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions following the Laemmli procedure<sup>16</sup>. The bands were visualized using Blue Coomassie R-250 staining. A molecular weight ladder from 97 to 14.4 KDa (GE, USA) was used to estimate the molecular weight of the resolved proteins. Densitometry analysis was performed by mean of Quantity One software (Bio-Rad, USA) for purity estimation.

## Immunoreactivity of the purified MAB

In order to evaluate the reactivity of the purified 7E1F7 MAB, an indirect ELISA was carried out as follow. Maxisorp (NUNC, Denmark) plate was coated with 100 µl/well of CPA at 10 µg/mL in PBS pH 7.4 for 16h at 4°C. After three washes with PBS containing 0.5% Tween 20, 250 µL/well of blocking solution (PBS, 3% skimmed milk) was added and incubated for 1h at 37°C. Excess of blocking solution was removed in a washing step and duplicated samples (100 µL/wells) of purified 7E1F7 MAB from each S.F were added in two-fold dilutions from 1000 ng/mL to 15 ng/mL in PBS. The same buffer was used as blank. The plate was incubated for 2h at 37°C. After three washes and addition of anti-mouse IgG/HRP conjugated diluted 1:1000 in PBS (100 µL/wells), the reaction was incubated for 1h at room temperature. Then, last four washing cycle was performed and OPD/H2O2 substrate was added. After 30 min, the reaction was stopped with 50 µL/well of 2M H2SO4 and absorbance was read in a Multiskan Microplate Reader (ThermoScientific, USA).

## Statistical Analysis

Data were analyzed using Graph Pad Prism 5 software (California, USA). Statistical significance between group mean values was analyzed by a Student's 2-tailed t test for two groups (HiTrap A vs CIM A columns). Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . For statistical analysis of the immunoreactivity assay results, a 2-way ANOVA comparison test was performed. Data are expressed as the mean optical density (OD) of samples (three runs) measured at 492nm plus standard deviation of three independent experiments.



## RESULTS

Identical procedures were used for either HiTrap A or CIM A columns. Figure 1 shows the chromatographic profiles obtained from three runs performed on each column. The U.F in each column were eluted in 4.5 mL for HiTrap A and 4 mL for CIM A, while S.F were eluted in 4 mL and 2.5 mL respectively.

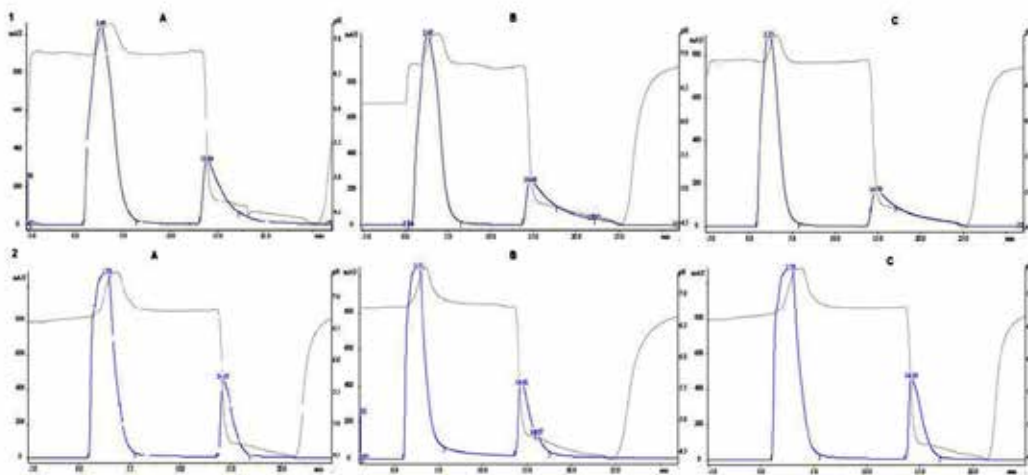
Figure 2 shows the analysis of all fractions obtained from each running. No significant variation in the volume of U.F was found between the HiTrap A and CIM A, while the volume corresponding to the S.F containing the 7E1F7 MAb was dramatically reduced in CIM A column and significant differences were found ( $p < 0.005$ ).

The mean of the estimated protein concentration in S.F was 0.463 mg/mL for HiTrap A and 0.915 mg/mL for CIM A column, while the mean of the total recovery was 1.853 mg and 2.287 mg per mL of ascites respectively. Statistical analysis showed significant differences between both columns (Figure 3).

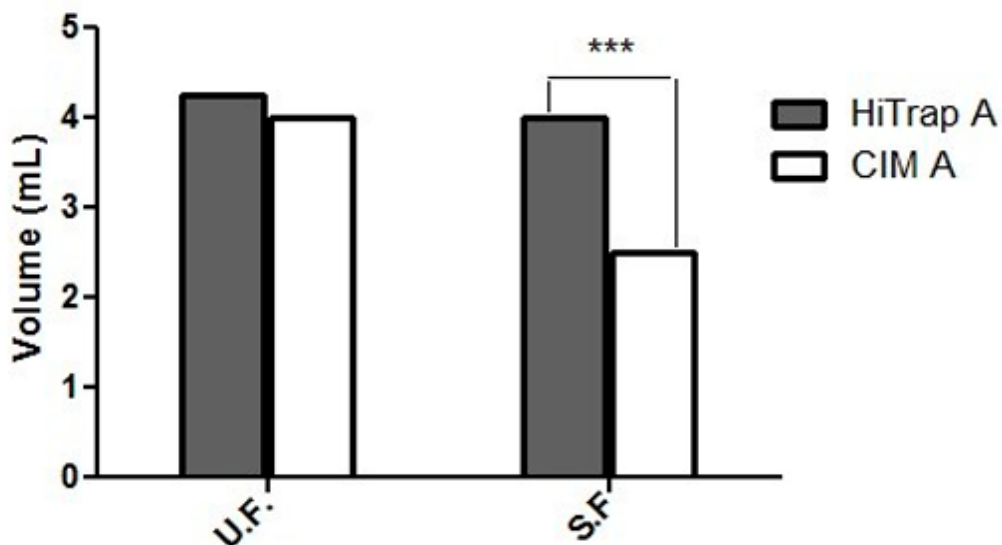
Chromatographic fractions were run on a 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions (Figure 4). Corresponding bands to heavy chain (50 KDa) and light chain (25 KDa) were identified in all S.F tracks. An additional band with MW of 66 KDa approximately was recorded in all S.F eluted from the HiTrap A column, which might be probably albumin.

The densitometric analysis (Table 1) showed that purity of the MAb obtained from CIM A column was over 99% while using HiTrap A column it was 95.5%. Low coefficient of variation ( $CV < 5\%$ ) was obtained between the three runs performed in each column.

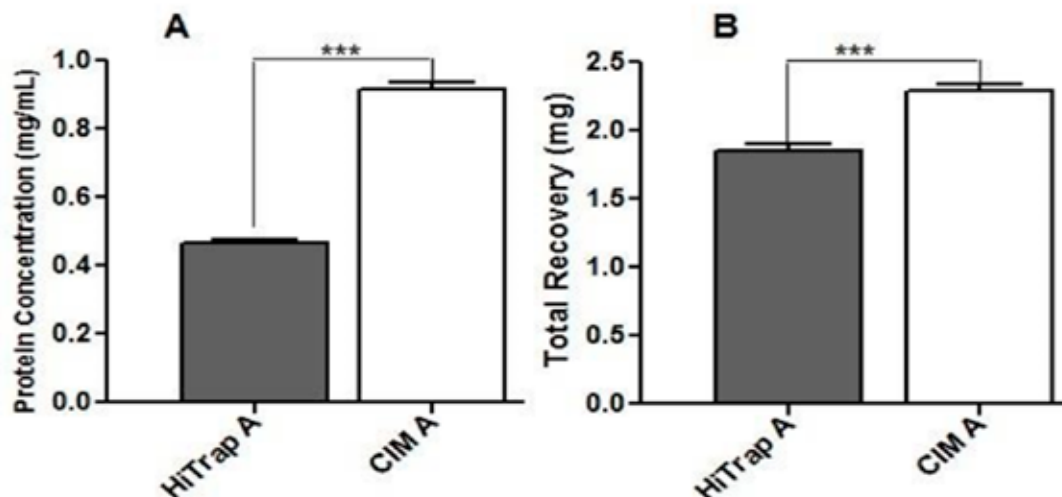
Immunoreactivity of the purified 7E1F7 MAb was evaluated in an indirect ELISA. The S.F from each run preserved its reactivity in all cases. No significant differences were noticed when the data were analyzed by the 2-way ANOVA. Results and statistical analysis of this assay are showed in Figure 5. The optical densities obtained from the lower concentration (15  $\mu\text{g/mL}$ ) were three times over than the PBS blank.



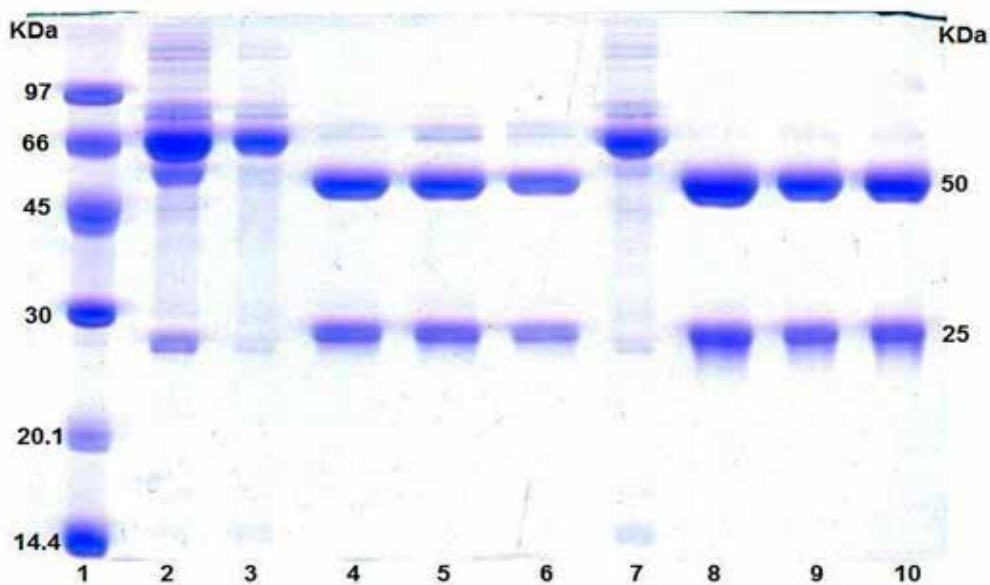
**Figura 1:** Chromatographic profiles (A, B and C) obtained from affinity column HiTrap A (1) and CIM A (2). Sample injected: 2 mL of ascites containing 7E1F7 MAb (1/2 in PBS). SF: eluted with 0.1 mol/L citric acid, pH 5.0



**Figura 2:** Comparison between the volume of U.F and S.F obtained from each affinity column (HiTrap A and CIM A). Data are expressed as the mean from three independent experiments. Significant differences between the means of the two groups (HiTrap A and CIM A) were determined by a Student's 2-tailed t test using the Graph Pad Prism 5 software (California). \*\*\*Statistically significant at  $p < 0.005$ .



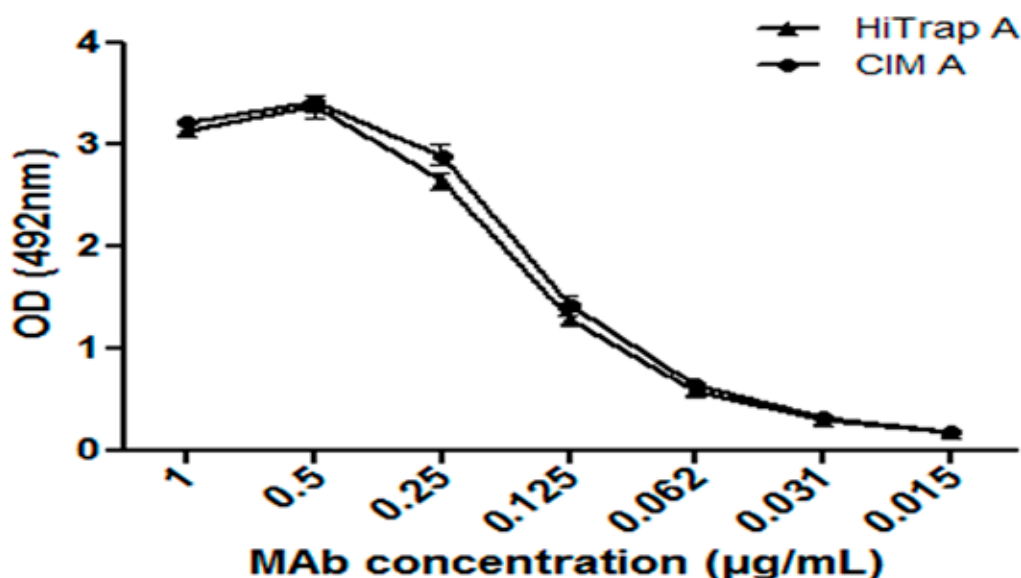
**Figura 3:** Comparison between Protein Concentration (A) and total recovery (B) in the S.F obtained from each affinity column (HiTrap A and CIM A). Data are expressed as the mean from three independent experiments. Significant differences between the means of the two groups (HiTrap A and CIM A) were determined by a Student’s 2-tailed t test using the Graph Pad Prism 5 software (California). \*\*\*Statistically significant at  $p < 0.005$ .



**Figura 4:** SDS-PAGE under reducing conditions on 12.5% resolving gel. Electrophoretic profile of each fraction involved in the purification process using both affinity columns, HiTrap A (line 3 through 6) and CIM A (line 7 through 10). Lane 1: molecular ladder, Lane 2: ascites. Lanes 3 and 7: U.F. Remaining lanes (4, 5, 6, 8, 9 and 10): S.F from 3 runs performed in each affinity column

Column employed	Runs	Percent Purity (%)	Mean	SD	CV %
HiTrap A	Run 1	96.78	95.51	2.14	2.24
	Run 2	93.04			
	Run 3	96.7			
CIM A	Run 1	99.46	99.23	0.20	0.20
	Run 2	99.08			
	Run 3	99.15			

**Table 1:** Densitometric analysis



**Figura 5:** Reactivity of the purified MAb according to the affinity column used (HiTrap and CIM A), evaluated in an indirect ELISA. Data are expressed as the mean optical density (OD) of samples (3 runs) measured at 492 nm + standard deviation of three independent experiments. Significant differences between the means of different groups were determined by a 2-way ANOVA comparison test using the Graph Pad Prism 5 software (California).

## DISCUSSION

Chromatography is a separation process based on the equilibrium between stationary and mobile phases. In chromatographic supports based on individual particles (beads), like Sepharose, the hydrodynamic behavior is well defined by Van Deemter equation<sup>17,18</sup>. Particle size and distribution, flow rate and diffusion are parameters that affect the resolution in this kind of support<sup>19</sup>. In contrast, monolith supports results in a unique piece as solid phase with a macroporous inner structure. The main features that determine the performance of any stationary phase for chromatography in flat monolithic disks are the surface chemistry, which determines the interaction of the analytes, and the pore size (distribution), which determines mass transfer and hydrodynamic behavior<sup>20</sup>. Increased mass transfer, rapid equilibrium and high adsorption capacity lead to rapid and high-resolution separations<sup>11,12</sup>. In this sense, CIM A column showed smaller elution volumes in U.F and S.F compared with HiTrap A column (Fig. 1). In addition, higher IgG adsorption was obtained too. Usually in our lab, with the traditional purification method using HiTrap G column<sup>13</sup>, the recovery of MAb purified is around 1.5 mg of MAb/mL of ascites (data not published) and using either HiTrap A or CIM A columns better results were obtained.

Protein A and protein G are bacterial proteins from *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* respectively, which naturally interacts with the Fc $\gamma$  fragment of antibodies. This feature makes them extremely useful selective ligands, for several routine applications. Examples include the purification of monoclonal, polyclonal IgG-type antibodies and its subclasses, and the adsorption and purification of immune complexes involving IgG. IgG subclasses can be isolated from ascites, cell culture supernatants and serum<sup>4,21</sup>. Another important factor to consider in affinity chromatography is the material used to hold the ligand within the column. Ideally, supports should have low nonspecific binding for sample components, it should be easy to modify for ligand attachment, and it should be stable under the flow-rate, pressure, and solvent conditions that will be employed in the analysis or purification of samples<sup>9</sup>. In this respect, the two-media used (HiTrap A and CIM A) met with this requirement. Purity levels over 95.5% were estimated by densitometry for both columns and this is enough for the intended use of this MAb in our lab.

The reactivity of the purified 7E1F7 MAb in all S.F was fully preserved after the purification step. Isotype IgG2a elutes from

protein A at pH value nearly to 5.0<sup>22</sup> therefore, the use of protein A as ligand, avoids the extreme drastic elution (pH 2.7) used in protein G that often cause protein denaturation. The purification of MABs from ascites using protein A linked to conventional particle bed (HiTrap A) is very well documented<sup>23</sup> but to our knowledge, there are none reports for monolith columns like CIM A. However, many MABs have been purified from cell supernatant using this technology<sup>24</sup>. The use of protein A coupled to monolith supports, as the BIA Separations Company, offers an attractive alternative to purify MABs from ascites with high recovery and purity levels and fully preserved reactivity. This paper constitutes the first report on the use of monolithic columns in the purification of monoclonal antibodies from ascites.

## References

- Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-7.
- Scopes RK. Protein purification: principles and practice / Robert K. Scopes. New York: Springer-Verlag; 1994.
- Janson JC. Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications: Wiley; 2012.
- Hober S, Nord K, Linholt M. Protein A chromatography for antibody purification. *Journal of Chromatography B*. 2007;848(1):40-7.
- Hou KC, Zaniewski R, Roy S. Protein A immobilized affinity cartridge for immunoglobulin purification. *Biotechnology and applied biochemistry*. 1991;13(2):257-68.
- Boi C, Dimartino S, Sarti GC. Performance of a new protein A affinity membrane for the primary recovery of antibodies. *Biotechnology progress*. 2008;24(3):640-7.
- Biedermann K, Sabater M, Sorensen J, Fiedler H, Emborg C. Quantitative binding studies of a monoclonal antibody to immobilized protein-A. *Bioseparation*. 1991;2(5):309-14.
- Porath J, Aspberg K, Drevin H, Axén R. Preparation of cyanogen bromide-activated agarose gels. *Journal of Chromatography A*. 1973;86:53-6.
- Hage DS. Affinity chromatography: a review of clinical applications. *Clinical chemistry*. 1999;45(5):593-615.
- Podgornik A, Yamamoto S, Peterka M, Krajnc NL. Fast separation of large biomolecules using short monolithic columns. *Journal of Chromatography B*. 2013;927:80-9.
- Josić D, Štrancar A. Application of Membranes and Compact, Porous Units for the Separation of Biopolymers. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 1999;38(2):333-42.
- Tennikova TB, Reusch J. Short monolithic beds: history and introduction to the field. *Journal of Chromatography A*. 2005;1065(1):13-7.

13. Reyes F, Amin N, Otero O, Aguilar A, Cuello M, Valdés Y, et al. Four monoclonal antibodies against capsular polysaccharides of *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, Y and W135: Its application in identity tests. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization*. 2013;41(4):275-8.
14. Reyes F, Otero O, Cuello M, Amin N, García L, Cardoso D, et al. Development of four sandwich ELISAs for quantitation of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, W and Y in multivalent vaccines. *Journal of immunological methods*. 2014;407:58-62.
15. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76-85.
16. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
17. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*: Wiley; 2011.
18. Poole CF, Poole SK. *Chromatography today* 1991. 1037- p.
19. Cazes J. *Encyclopedia of Chromatography*: Taylor & Francis; 2005.
20. Hahn R, Panzer M, Hansen E, Mollerup J, Jungbauer A. Mass transfer properties of monoliths. *Separation Science & Technology*. 2002;37(7):1545-65.
21. McCue JT, Kemp G, Low D, Quinones-Garcia I. Evaluation of protein-A chromatography media. *Journal of chromatography A*. 2003;989(1):139-53.
22. Healthcare GE. *Antibody Purification Handbook* 2002-2015. 48- p.
23. Carlsson M, Heijbel A, Hügqvist A-C. Convenient Purification of Monoclonal Antibodies using HiTrap rProtein A FF. G. E. Healthcare, 2007.
24. Beerli RR, Bauer M, Schmitz N, Buser RB, Gwerder M, Muntwiler S, et al. Prophylactic and therapeutic activity of fully human monoclonal antibodies directed against influenza A M2 protein. *Virology journal*. 2009;6:224.

**Recibido:** diciembre de 2016.

**Aprobado:** febrero de 2016.

#ClimateChange

## WHO IS AT RISK OF CLIMATE CHANGE?

Those **living in poverty**, as well as **women, children and the elderly**.

**Outdoor workers** and people **living with chronic medical conditions**.

**Children are the most vulnerable** due to long exposure to environmental risks.

**EVERYONE  
EVERYWHERE**

Those living in **megacities, small island developing states** and other **coastal, mountainous and polar regions**.

Countries with **weak health systems** will be least able to prepare and respond.



## INVESTIGACIÓN

# Evaluación físico-química y microbiológica de la calidad del agua de los ríos Machángara y Monjas de la red hídrica del distrito metropolitano de Quito.

Physic chemical and microbiological assessment of water quality in Machángara and Monjas rivers from Quito's metropolitan district.

Andrea Campaña<sup>1</sup>, Ekaterina Gualoto<sup>1</sup> y Viviana Chiluisa-Utreras<sup>2</sup>

DOI. 10.21931/RB/2017.02.02.6

## RESUMEN

El presente estudio es una evaluación de la calidad y condición actual del agua de los ríos Machángara y Monjas, se midió parámetros físico-químicos como caudal, pH, temperatura, oxígeno disuelto y Potencial de Óxido Reducción (ORP) mediante monitoreo *in situ*, durante los meses de agosto a noviembre del 2014, y se recolectó muestras de agua para el análisis de parámetros microbiológicos (coliformes totales CT y coliformes fecales CF), aplicando el método de fermentación de tubos múltiples, establecido en el Estándar Métodos (Standard Methods); los análisis evidenciaron que ambos ríos superan ampliamente los límites permisibles establecidos en el Texto Unificado de Legislación Secundaria Medio Ambiental (TULSMA) para coliformes totales y fecales, temperatura y oxígeno disuelto, en el caso del río Monjas; esto impediría su aprovechamiento en actividades pecuarias, agrícolas y de preservación de flora y fauna, se evidenció además un incremento considerable en el caudal de ambos ríos y se observa que el valor de ORP de ambos ríos, es menor al valor óptimo de 650mV; los resultados confirmaron la deficiente calidad del agua de los ríos estudiados, cuyas subcuencas forman parte de la Red Hídrica del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) y atraviesan zonas de gran densidad poblacional, recibiendo diariamente descargas domésticas e industriales.

**Palabras Claves:** Coliformes totales, coliformes fecales, calidad, parámetros fisicoquímicos, Machángara, Monjas.

## ABSTRACT

This study analyses the current condition of Machángara and Monjas rivers, by evaluating the quality of its waters. Physical and chemical parameters such as: flow, pH, temperature, dissolved oxygen and ORP were evaluated by *in situ* monitoring, during the months of August to November 2014. Water samples were also taken for microbiological analysis (total coliforms TC and fecal coliforms FC) in laboratory, using the Multiple Tube Fermentation method, established by the Standard Methods. The analyzes show that both rivers far exceed the permissible limits established in TULSMA for total coliforms, fecal coliforms, temperature, and dissolved oxygen in the case of Monjas River. This prevents their use for wildlife preservation, and agricultural and livestock activities. A considerable increase in the flow of both rivers was also reflected on the results; in addition, the ORP value is in both, less than the 650mV optimum value. The obtained results confirm the poor water quality of the studied rivers, which are an important part of the DMQ's water network and run through areas of high population density, receiving domestic and industrial discharges, daily.

**Key Words:** Total coliforms, fecal coliforms, water quality, physicochemical parameters, Machángara, Monjas.

## Introducción

“El Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) ocupa una superficie de 4.235,2 km<sup>2</sup> y alberga al 15,5% de la población nacional”<sup>1</sup>. De acuerdo a las proyecciones de población dadas por el Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento, en el Plan Maestro 2010 -2040, la población del DMQ crecerá de 2,4 a 4,2 millones de habitantes en el 2040, lo que generará que la demanda media diaria de agua potable se incremente de 7200 a 10300 L/s<sup>2</sup>.

Los ríos Machángara y Monjas presentan una larga historia de contaminación, donde los efectos antropogénicos han sido determinantes, por cuanto atraviesan las zonas más pobladas de Quito y son altamente presionados por las descargas de aguas residuales, de

origen industrial y doméstico<sup>3</sup>. Según datos del Plan de Desarrollo 2012-2022 emitido por la Alcaldía de Quito, los ríos Machángara y Monjas, reciben el 70% y 20% de las descargas de la ciudad de Quito, respectivamente, el restante 10% pertenece a descargas no registradas. (Figura 1)

De acuerdo a información emitida por la SENA-GUA<sup>4</sup>, el principal foco de contaminación de estos efluentes son las descargas directas de aguas servidas y desechos provenientes de cuencas de drenaje urbano, donde los principales contaminantes que afectan a los ríos son, coliformes fecales (*Escherichia coli*) y totales, detergentes (tensoactivos), aceites y grasas, las cuales superan en todos los casos los límites establecidos en el TULSMA, Libro VI, Anexo I, lo que impide su aprovechamiento<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Laboratorio de Investigación, Análisis y Monitoreo de Quito IAMQ, Secretaría de Ambiente, Av. Río Coca E6 – 85 e Isla Genovesa, Quito, Ecuador.

<sup>2</sup> Laboratorios de Ciencias de la Vida CIVABI, Universidad Politécnica Salesiana, Quito – Ecuador.

Correspondence: andreaclozano10@hotmail.com



Figura 1: Ubicación geográfica de los puntos de muestreo de los Ros Machángara y Monjas

## Introducción

“El Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) ocupa una superficie de 4.235,2 km<sup>2</sup> y alberga al 15,5% de la población nacional”<sup>1</sup>. De acuerdo a las proyecciones de población dadas por el Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento, en el Plan Maestro 2010 -2040, la población del DMQ crecerá de 2,4 a 4,2 millones de habitantes en el 2040, lo que generará que la demanda media diaria de agua potable se incremente de 7200 a 10300 L/s<sup>2</sup>.

Los ríos Machángara y Monjas presentan una larga historia de contaminación, donde los efectos antropogénicos han sido determinantes, por cuanto atraviesan las zonas más pobladas de Quito y son altamente presionados por las descargas de aguas residuales, de origen industrial y doméstico<sup>3</sup>. Según datos del Plan de Desarrollo 2012-2022 emitido por la Alcaldía de Quito, los ríos Machángara y Monjas, reciben el 70% y 20% de las descargas de la ciudad de Quito, respectivamente, el restante 10% pertenece a descargas no registradas. (Figura 1)

De acuerdo a información emitida por la SENAGUA<sup>4</sup>, el principal foco de contaminación de estos efluentes son las descargas directas de aguas servidas y desechos provenientes de cuencas de drenaje urbano, donde los principales contaminantes que afectan a los ríos son, coliformes fecales (*Escherichia coli*) y totales, detergentes (tensoactivos), aceites y grasas, las cuales superan en todos los casos los límites establecidos en el TULSMA, Libro VI, Anexo I, lo que impide su aprovechamiento<sup>3</sup>.

Villacís<sup>5</sup>, indica que algunos de los factores que agravan los problemas de contaminación en los ríos del DMQ son: la elevada densidad poblacional del cantón Quito, que genera una mayor presión de emisiones de desechos y demanda de agua; el poco control existente en los sitios de acopio de desechos sólidos, lo que facilita que las industrias contaminen ríos y fuentes de agua cercanas; que el DMQ no cuenta con un sistema de alcantarillado que separe las aguas residuales contaminadas de las aguas de lluvia y por último, no existe tratamiento post-uso del agua potable, y esta es vertida sin tratamiento alguno a los ríos<sup>6</sup>.

Los agentes patógenos ligados a la transmisión hídrica de enfermedades son las bacterias, virus, protozoos, helmintos y cianobacterias. Estos microorganismos pueden causar enfermedades con diferentes niveles de gravedad, desde una gastroenteritis simple hasta cuadros graves de diarrea, disentería, hepatitis o fiebre tifoide<sup>7</sup>. Los Indicadores Básicos de Salud del 2010, reportan 32676 casos de diarreas y gastroenteritis de origen infeccioso, y ubican estas patologías en el segundo lugar de las enfermedades de notificación obligatoria<sup>8</sup>.

En consideración a la información referida, la presente investigación evidenció el estado de contaminación actual de los ríos Machángara y Monjas a través de la determinación de parámetros físico-químicos y microbiológicos (coliformes totales y fecales)<sup>9</sup> en dos puntos de la red hídrica del DMQ, para orientar la investigación científica hacia la generación de propuestas técnicas basada en acciones comunitarias, medidas administrativas y operaciones técnicas viables; que busquen solucionar los problemas de contaminación severa que sufren los dos principales ríos capitalinos.

## MATERIALES Y METODOS

### Localización

Los sitios de muestreo seleccionados tanto para el río Machángara, como para el río Monjas, se escogieron considerando factores de seguridad y accesibilidad y corresponden a los puntos establecidos por la Secretaría de Ambiente para el monitoreo de la calidad del agua en la Red Hídrica del DMQ, su ubicación geográfica, coordenadas y altitud se muestra en la Tabla 1 éstos datos fueron registrados con el uso de un GPS Garmin GPSMAP 62sc. Se estudió 3 muestras de agua por cada río y en cada muestra se midió los parámetros físico-químicos: pH, temperatura, ORP, oxígeno disuelto, caudal; y los parámetros microbiológicos: coli-

$$\frac{\text{Valor de NMP (de la tabla)} \cdot 10}{\text{Mayor volumen estudiado}} = m$$

formes totales, coliformes fecales.

### Medición de parámetros *in situ*

Para determinar pH, temperatura y ORP se usó un equipo multiparámetros marca Consort, modelo C562, y con un Kit Multiparámetros, marca Hach, modelo HQ40d, se midió el oxígeno disuelto. Para la medición *in situ* del caudal se utilizó un molinete Global Water 800-876-1172, modelo FP111, serie 1124158994.

### Determinación de coliformes totales y fecales

La determinación de coliformes totales y fecales se realizó aplicando la Técnica de Fermentación de Tubos Múltiples, en conformidad a lo establecido en el Standard Methods 9222 A-E. Por tratarse de agua muy contaminada y con el fin de obtener resultados más precisos, se realizaron diluciones en escala logarítmica hasta 10<sup>-6</sup> formando un juego de cinco tubos, del que derivó

LUGAR	UBICACIÓN	COORDENADAS GEOGRÁFICAS	ALTITUD (mts)
Orilla río Machángara	Provincia de Pichincha, Cantón Quito - Parroquia Cumbayá- Central Hidroeléctrica Cumbayá EEQ	78°24'56.55''	2231
Orilla río Monjas	Provincia de Pichincha- Cantón Quito - Parroquia San Antonio- Piscinas Municipales	78°26'22.41''	2342

Tabla 1: Ubicación puntos de muestreo

Parámetros físico-químicos normados			Machángara	Monjas
pH	Preservación flora y fauna	6, 5-9	7,39	7,03
	Uso agrícola	6-9		
	Uso pecuario	6-9		
Oxígeno disuelto	Preservación flora y fauna	No menor a 6mg/l	7,01	5,5
	Uso pecuario	3,06mg/l		
Temperatura	Preservación flora y fauna	Condiciones naturales + 3	21,5	22,5
Caudal	-	-	1,8	0,8
ORP	-	-	268,3	313,3

Tabla 2: Comparación de valores medios de parámetros físico-químicos con límites permisibles de TULSMA

el código de 3 dígitos para el Número más probable (NMP). Estas diluciones se sembraron siguiendo el procedimiento establecido por el método<sup>10</sup>.

### Tratamiento de los resultados

El procesamiento de datos obtenidos se realizó de acuerdo a la matriz desarrollada y adaptada por las autoras. Una vez determinada la combinación más adecuada de diluciones se realizó el cálculo del NMP de coliformes totales y fecales, en función de la tabla de lectura y registro del NMP establecida en el *Standard Methods*. El valor final se calculó aplicando la siguiente fórmula:

Se realizó un análisis de correlación estadística entre los datos obtenidos de la medición de parámetros físico-químicos, para determinar el grado de dependencia existente entre ellos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Parámetros físico-químicos

Los muestreos se realizaron en los meses de agosto, septiembre y octubre del 2014 en intervalos de 15 días, obteniéndose los valores de pH que se muestran en la Tabla 2, los cuales son comparados con los límites permisibles para aguas de uso agrícola, pecuario y preservación de flora y fauna, establecidos por la normativa TULSMA, Libro VI, Anexo 1, que rige al DMQ<sup>11</sup>. Estos valores muestran que los procesos de degradación (autodepuración), son mínimos; ya que normalmente bajo procesos activos de degradación biológica el pH natural tiende a acidificarse.

Esta aseveración se sustenta con base en los valores de Demanda biológica de oxígeno (DBO5) reportados por la Secretaría

de Ambiente en el año 2013, que muestran concentraciones de 107,8 ppm para el río Machángara y de 98,00 ppm, para el río Monjas, poniendo en evidencia que no se está produciendo una biodegradación apreciable.

El valor medio de oxígeno disuelto del río Machángara (7,01 mg/L) es superior al límite mínimo permisible establecido por el TULSMA para aguas de uso pecuario y preservación de flora y fauna, es decir presenta un valor mayor a 6mg/L, por otro lado el río Monjas mostró una concentración media de oxígeno disuelto (5,50 mg/L), menor al límite mínimo permisible establecido para preservación de flora y fauna, pero dentro del límite establecido para aguas de uso pecuario.

Puesto que el oxígeno disuelto está directamente relacionado con el potencial Redox, a medida que el ORP disminuye por la presencia de altas densidades microbianas, disminuye la concentración de oxígeno disuelto, lo que provoca la reducción de iones y moléculas importantes para la nutrición de microorganismos y formas de vida superior<sup>12</sup>.

Reinoso<sup>13</sup>, determina un caudal mensual promedio para el río Monjas de 0.03548 m<sup>3</sup>/s y de 0.4165m<sup>3</sup>/s para el río Machángara en el año 2013, en tanto que los datos obtenidos por la investigación, mostrados en la Tabla 2, evidencian un incremento considerable del caudal en ambos ríos. Esto puede deberse al constante crecimiento poblacional que sufren las zonas de estudio y por tanto al aumento de las descargas domésticas e industriales. Los factores ambientales como la temperatura y principalmente las precipitaciones, también influyen en este aumento, por ende, existe un mayor flujo de descargas al sistema de alcantarillado, elevando el caudal diario de estos ríos<sup>14, 15</sup>.

Los valores medios de ORP obtenidos para los ríos Monjas

Río	Temperatura	Oxígeno disuelto	pH	ORP	Caudal
<b>Machángara</b>					
<i>Temperatura</i>	1				
<i>Oxígeno disuelto</i>	-0,8538366	1			
<i>pH</i>	0,09578263	0,43636511	1		
<i>ORP</i>	0,82311266	-0,99840762	-0,48642727	1	
<i>Caudal</i>	-0,81415234	0,99740596	0,5	-0,99987828	1
<b>Río Monjas</b>					
<i>Temperatura</i>	1				
<i>Oxígeno disuelto</i>	-0,52828401	1			
<i>pH</i>	0,58065133	-0,99801929	1		
<i>ORP</i>	-0,99980188	0,51127892	-0,56433084	1	
<i>Caudal</i>	1	-0,52828401	0,58065133	-0,99980188	1

Tabla 3: Correlación parámetros físico-químicos ríos Machángara y Monjas

## Introducción

“El Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) ocupa una superficie de 4.235,2 km<sup>2</sup> y alberga al 15,5% de la población nacional”<sup>1</sup>. De acuerdo a las proyecciones de población dadas por el Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento, en el Plan Maestro 2010 -2040, la población del DMQ crecerá de 2,4 a 4,2 millones de habitantes en el 2040, lo que generará que la demanda media diaria de agua potable se incremente de 7200 a 10300 L/s<sup>2</sup>.

Los ríos Machángara y Monjas presentan una larga historia de contaminación, donde los efectos antropogénicos han sido determinantes, por cuanto atraviesan las zonas más pobladas de Quito y son altamente presionados por las descargas de aguas residuales, de origen industrial y doméstico<sup>3</sup>. Según datos del Plan de Desarrollo 2012-2022 emitido por la Alcaldía de Quito, los ríos Machángara y Monjas, reciben el 70% y 20% de las descargas

de la ciudad de Quito, respectivamente, el restante 10% pertenece a descargas no registradas. (Figura 1)

De acuerdo a información emitida por la SENAGUA<sup>4</sup>, el principal foco de contaminación de estos efluentes son las descargas directas de aguas servidas y desechos provenientes de cuencas de drenaje urbano, donde los principales contaminantes que afectan a los ríos son, coliformes fecales (*Escherichia coli*) y totales, detergentes (tensoactivos), aceites y grasas, las cuales superan en todos los casos los límites establecidos en el TULSMA, Libro VI, Anexo I, lo que impide su aprovechamiento<sup>3</sup>.

Villacis<sup>5</sup>, indica que algunos de los factores que agravan los problemas de contaminación en los ríos del DMQ son: la elevada densidad poblacional del cantón Quito, que genera una mayor presión de emisiones de desechos y demanda de agua; el poco control existente en los sitios de acopio de desechos sólidos, lo que facilita que las industrias contaminen ríos y fuentes de agua cercanas; que el DMQ no cuenta con un sistema de alcantarillado que separe las aguas residuales contaminadas de las aguas de llu-

Criterio TULSMA Libro VI	Limite permisible		Machángara		Monjas	
	CT	CF	CT	CF	CT	CF
<i>Preservación flora y fauna</i>	-	200				
<i>Uso agrícola</i>	1 000	-	337777	181110	407777	234444
<i>Uso pecuario</i>	Menor a 1 000	Promedio mensual menor a 5 000	NMP/100ml	NMP/100ml	NMP/100ml	NMP/100ml

Tabla 4: Comparación de valores medios de NMP/100ml para coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF) con límites permisibles del TULSMA



via y por último, no existe tratamiento post-uso del agua potable, y esta es vertida sin tratamiento alguno a los ríos<sup>6</sup>.

Los agentes patógenos ligados a la transmisión hídrica de enfermedades son las bacterias, virus, protozoos, helmintos y cianobacterias. Estos microorganismos pueden causar enfermedades con diferentes niveles de gravedad, desde una gastroenteritis simple hasta cuadros graves de diarrea, disentería, hepatitis o fiebre tifoide<sup>7</sup>. Los Indicadores Básicos de Salud del 2010, reportan 32676 casos de diarreas y gastroenteritis de origen infeccioso, y ubican estas patologías en el segundo lugar de las enfermedades de notificación obligatoria<sup>8</sup>.

En consideración a la información referida, la presente investigación evidenció el estado de contaminación actual de los ríos Machángara y Monjas a través de la determinación de parámetros físico-químicos y microbiológicos (coliformes totales y fecales)<sup>9</sup> en dos puntos de la red hídrica del DMQ, para orientar la investigación científica hacia la generación de propuestas técnicas basada en acciones comunitarias, medidas administrativas y operaciones técnicas viables; que busquen solucionar los problemas de contaminación severa que sufren los dos principales ríos capitalinos.

## MATERIALES Y METODOS

### Localización

Los sitios de muestreo seleccionados tanto para el río Machángara, como para el río Monjas, se escogieron considerando factores de seguridad y accesibilidad y corresponden a los puntos establecidos por la Secretaría de Ambiente para el monitoreo de la calidad del agua en la Red Hídrica del DMQ, su ubicación geográfica, coordenadas y altitud se muestra en la Tabla 1 éstos datos fueron registrados con el uso de un GPS Garmin GPSMAP 62sc. Se estudió 3 muestras de agua por cada río y en cada muestra se midió los parámetros físico-químicos: pH, temperatura, ORP, oxígeno disuelto, caudal; y los parámetros microbiológicos: coliformes totales, coliformes fecales.

### Medición de parámetros *in situ*

Para determinar pH, temperatura y ORP se usó un equipo multiparámetros marca Consort, modelo C562, y con un Kit Multiparámetros, marca Hach, modelo HQ40d, se midió el oxígeno disuelto. Para la medición *in situ* del caudal se utilizó un molinete Global Water 800-876-1172, modelo FP111, serie 1124158994.

### Determinación de coliformes totales y fecales

La determinación de coliformes totales y fecales se realizó aplicando la Técnica de Fermentación de Tubos Múltiples, en conformidad a lo establecido en el Standard Methods 9222 A-E. Por tratarse de agua muy contaminada y con el fin de obtener resultados más precisos, se realizaron diluciones en escala logarítmica hasta  $10^{-6}$  formando un juego de cinco tubos, del que derivó el código de 3 dígitos para el Número más probable (NMP). Estas diluciones se sembraron siguiendo el procedimiento establecido por el método<sup>10</sup>.

### Tratamiento de los resultados

El procesamiento de datos obtenidos se realizó de acuerdo a la matriz desarrollada y adaptada por las autoras. Una vez determinada la combinación más adecuada de diluciones se realizó el cálculo del NMP de coliformes totales y fecales, en función de la tabla de lectura y registro del NMP establecida en el *Standard Methods*. El valor final se calculó aplicando la siguiente fórmula:

Se realizó un análisis de correlación estadística entre los datos obtenidos de la medición de parámetros físico-químicos, para determinar el grado de dependencia existente entre ellos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Parámetros físico-químicos

Los muestreos se realizaron en los meses de agosto, septiembre y octubre del 2014 en intervalos de 15 días, obteniéndose los valores de pH que se muestran en la Tabla 2, los cuales son comparados con los límites permisibles para aguas de uso agrícola, pecuario y preservación de flora y fauna, establecidos por la normativa TULSMA, Libro VI, Anexo 1, que rige al DMQ<sup>11</sup>. Estos valores muestran que los procesos de degradación (autodepuración), son mínimos; ya que normalmente bajo procesos activos de degradación biológica el pH natural tiende a acidificarse.

Esta aseveración se sustenta con base en los valores de Demanda biológica de oxígeno (DBO5) reportados por la Secretaría de Ambiente en el año 2013, que muestran concentraciones de 107,8 ppm para el río Machángara y de 98,00 ppm, para el río Monjas, poniendo en evidencia que no se está produciendo una biodegradación apreciable.

El valor medio de oxígeno disuelto del río Machángara (7,01 mg/L) es superior al límite mínimo permisible establecido por el TULSMA para aguas de uso pecuario y preservación de flora y fauna, es decir presenta un valor mayor a 6mg/L, por otro lado el río Monjas mostró una concentración media de oxígeno disuelto (5,50 mg/L), menor al límite mínimo permisible establecido para preservación de flora y fauna, pero dentro del límite establecido para aguas de uso pecuario.

Puesto que el oxígeno disuelto está directamente relacionado con el potencial Redox, a medida que el ORP disminuye por la presencia de altas densidades microbianas, disminuye la concentración de oxígeno disuelto, lo que provoca la reducción de iones y moléculas importantes para la nutrición de microorganismos y formas de vida superior<sup>12</sup>.

Reinoso<sup>13</sup>, determina un caudal mensual promedio para el río Monjas de 0.03548 m<sup>3</sup>/s y de 0.4165m<sup>3</sup>/s para el río Machángara en el año 2013, en tanto que los datos obtenidos por la investigación, mostrados en la Tabla 2, evidencian un incremento considerable del caudal en ambos ríos. Esto puede deberse al constante crecimiento poblacional que sufren las zonas de estudio y por tanto al aumento de las descargas domésticas e industriales. Los factores ambientales como la temperatura y principalmente las precipitaciones, también influyen en este aumento, por ende, existe un mayor flujo de descargas al sistema de alcantarillado, elevando el caudal diario de estos ríos<sup>14, 15</sup>.

Los valores medios de ORP obtenidos para los ríos Monjas (268,3 mV) y Machángara (313,3 mV) son inferiores a 650 mV, que es el valor de referencia para que el agua sea considerada segura. De acuerdo a Lynch y Poole (1979) citados por Fuentes<sup>12</sup>, esto es indicativo de un ambiente altamente reductor, que puede ser ocasionado por las descargas masivas de materia orgánica oxidable del alcantarillado sanitario, lo que aumenta la densidad de bacterias anaerobias facultativas, como las bacterias del grupo Coliformes, quienes se encuentran en grandes cantidades en los ríos estudiados, tal como se muestra en los resultados obtenidos del análisis microbiológico y cuya actividad metabólica altera el potencial Redox.

### Análisis de Correlación

El análisis de correlación nos permitió medir el grado de relación existente entre los parámetros estudiados. En la Tabla 3 se muestran los valores obtenidos para los parámetros agrupados de ambos ríos. De los cinco parámetros medidos en cada río, tres de ellos (temperatura, oxígeno disuelto y pH), se contemplan en la normativa vigente. Para el río Machángara, uno de los tres parámetros normados (temperatura), no se encuentran dentro de los límites permisibles establecidos y que dos de los cinco parámetros monitoreados evidencian valores fuera de los límites determinados para aguas de calidad. Por otro lado, en el río Monjas, que dos

de los tres parámetros normados (oxígeno disuelto, temperatura) se ubican fuera de norma y cuatro de los cinco parámetros analizados muestran baja calidad.

Se observa que existe una correlación negativa considerable, entre la temperatura y el ORP con el oxígeno disuelto. También se evidencia una correlación negativa considerable entre el caudal y ORP, a diferencia de la correlación positiva que presentan el caudal y el oxígeno disuelto. Existe una correlación negativa considerable, entre el pH y el oxígeno disuelto. Además, existe una correlación negativa considerable entre el ORP, con el caudal y la temperatura, a diferencia de la correlación positiva perfecta que presentan el caudal y la temperatura. Esto indica que la variación en alguno de los parámetros, siempre incidirá de forma positiva o negativa sobre los demás, lo que puede afectar la calidad del agua.

### Parámetros Microbiológicos

De los valores de NMP obtenidos de las tres repeticiones realizadas con cada muestra de los ríos Machángara y Monjas, así como del valor medio calculado con estos datos, se obtuvo los valores medios y un valor medio total para Coliformes Totales y Fecales de ambos ríos, como se muestra en la Tabla 4. Los resultados evidencian que el río Machángara supera los límites establecidos por la normativa vigente, puesto que presenta una concentración media de CF de 181110 NMP/100ml que es 905,5 veces superior al límite máximo permisible establecido para preservación de flora y fauna, y 36,22 veces superior al promedio mensual de 5000 establecido para aguas de uso pecuario. En tanto que la concentración media de Coliformes Totales (CT) para uso agrícola y pecuario es 337,7 veces superior a la norma, presentando un valor de 337777 NMP/100ml.

El río Monjas tampoco cumple con lo establecido por la norma puesto que la concentración de CF, es 1172,22 veces superior al límite permisible establecido para la conservación de flora y fauna y 46,88 veces superior al promedio mensual establecido para uso agrícola, presentando un valor de 234444 NMP/100ml. En tanto que la concentración media de CT para uso agrícola y pecuario es 234,4 veces superior a norma.

Según Reinoso<sup>13</sup>, la concentración de Coliformes Totales en el río Machángara es de 24 millones NMP/100ml y la de CF 24000 NMP/100ml y según el documento "Perspectivas del ambiente y cambio climático en el medio urbano del DMQ" del Fondo Ambiental DMQ (2011), el río Machángara presenta  $6,60 \times 10^7$  NMP/100ml de CT y  $5,61 \times 10^7$  NMP/100ml de CF y el río Monjas CT  $3,53 \times 10^7$  NMP/100ml de CT y  $1,10 \times 10^6$  NMP/100ml de CF. Estos valores difieren con los obtenidos en la investigación, pero esta variación es aparente, puesto que el método está basado en el principio de incertidumbre que ofrece un límite de confianza sumamente amplio. Este grado de incertidumbre no da certezas, pero nos permite obtener un valor estimado<sup>10</sup>.

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El río Monjas presenta mayor deterioro de la calidad microbiológica del agua, pues sus valores de NMP para CT y principalmente CF son levemente mayores a los registrados en el río Machángara, esto puede deberse a que en el sitio de muestreo del río Monjas se encuentra un punto directo de descarga de aguas residuales domésticas e industriales, por ello los residuos sanitarios no logran someterse a los procesos de autodepuración propios del río, además, la elevada temperatura registrada conjuntamente con los bajos valores bajos de ORP y de caudal presentados en este punto, generan condiciones que permiten una mayor supervivencia y proliferación de los microorganismos. En el río Machángara los procesos propios del funcionamiento de la hidroeléctrica de Cumbayá (tamizado, agitación y decantación), permiten reducir la cantidad de materia orgánica presente en las aguas y reducir levemente los valores de NMP en sus aguas.

Existen ciertos inconvenientes que impiden el cumplimiento cabal de la norma con respecto a parámetros microbiológicos, uno de ellos es la normativa vigente (TULSMA), donde se establece como parámetro para determinar la calidad microbiológica del agua el Número Más Probable (NMP) hecho que limita la selección de metodologías a ser aplicadas en la evaluación microbiológica. Uno de los pocos métodos que permiten su estimación es la Técnica de Fermentación de Tubos Múltiples mismo que no se adapta a la realidad ambiental de nuestro entorno, volviéndose necesaria la introducción de modificaciones o el empleo de distintos métodos de cuantificación, acordes a los altos grados de contaminación que presentan nuestros ríos, por ello, sería importante considerar una posible modificación de la normativa, para que se establezca los límites permisibles de coliformes fecales y totales en términos de UFC y no en NMP. Esta modificación permitirá el uso de métodos de evaluación más rápidos, sencillos y confiables.

### Agradecimientos

Al Dr. Miguel Gualoto y al Dr. Luis Valdés por su valioso apoyo y guía. A la Secretaría de Ambiente del Distrito Metropolitano de Quito y al Instituto Nacional de Energías Renovables por su amable colaboración.

### Referencias bibliográficas

1. Municipio del DMQ. (diciembre de 2011). Plan de Desarrollo 2012-2022. Recuperado el 07 de abril de 2015, de Google: [http://www.centrocultural-quito.com/imagesFTP/13644.Plan\\_de\\_Development\\_Local\\_2012\\_2022.pdf](http://www.centrocultural-quito.com/imagesFTP/13644.Plan_de_Development_Local_2012_2022.pdf)
2. EPMAPS. (marzo de 2011). Google. Recuperado el 04 de abril de 2015, de Plan Maestro de Agua Potable 2010-2040: [http://www.aguaquito.gov.ec/sites/default/files/documentos/plan\\_maestro\\_agua\\_potable.pdf](http://www.aguaquito.gov.ec/sites/default/files/documentos/plan_maestro_agua_potable.pdf)
3. Fondo Ambiental DMQ. (2011). "Perspectivas del ambiente y cambio climático en el medio urbano" ECCO- Distrito Metropolitano de Quito, Pichincha, Ecuador: CrearImagen.
4. SENAGUA. (febrero de 2009). "Problemática y Conflictos sobre los Recursos Hídricos por efectos del cambio Climático". Recuperado el 28 de febrero de 2015, de Google: [http://www.utpl.edu.ec/obsa/wp-content/uploads/2012/09/3\\_ded-senagua\\_capt-0\\_resumen-ejecutivo.pdf](http://www.utpl.edu.ec/obsa/wp-content/uploads/2012/09/3_ded-senagua_capt-0_resumen-ejecutivo.pdf)
5. Villacís, B. (2005). La Crisis del Oro Azul: Un análisis de la sustentabilidad del agua en la ciudad de Quito. Recuperado el 2015 de abril de 08, de Repositorio FLACSO: <http://repositorio.flacsoandes.edu.ec/bitstream/10469/269/3/TFLACSO-02-2005BAV.pdf>
6. Juez, O. (04 de septiembre de 2011). Mar y ríos, depósitos de aguas servidas. (Diario La Hora, Entrevistador)
7. Arcos, M. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. Nova-Publicación Científica, 70-73.
8. Ministerio de Salud Pública. (2010). Indicadores Básicos de Salud Ecuador 2010. Recuperado el 08 de abril de 2015, de Google: [file:///C:/Users/User/Downloads/sds\\_Indicadores%202010%20ULTIMO.pdf](file:///C:/Users/User/Downloads/sds_Indicadores%202010%20ULTIMO.pdf)
9. Palacios, C. (2013). Distribución de coliformes fecales en el área marina de la costa ecuatoriana en las provincias de Esmeraldas y Manabí, 2008-2013. Recuperado el 08 de abril de 2015, de Google: [http://www.inocar.mil.ec/web/phocadownloadpap/actas\\_oceanograficas/acta18/OCE1801\\_6.pdf](http://www.inocar.mil.ec/web/phocadownloadpap/actas_oceanograficas/acta18/OCE1801_6.pdf)
10. Rice, E. (2012). Standard Methods. Washington: America Public Health Association
11. TULSMA. (31 de marzo de 2003). Google. Recuperado el 20 de febrero de 2015, de Norma de Calidad Ambiental y Descargas de Efluentes: Recurso Agua: <http://faolex.fao.org/docs/pdf/ecu112180.pdf>
12. Fuentes, F. (2002). Google. Recuperado el 2015 de junio de 22, de Manual de Laboratorios: Ecología de Microorganismos: <http://ocw.um.es/ciencias/ecologia/lectura-obligatoria-1/p1-intro.pdf>
13. Reinoso, I. (2015). Evaluación del Río Machángara. Quito: Universidad Politécnica Nacional.
14. Granda, O. (2007). Plan Parcial de Ordenamiento Territorial de las Parroquias Equinocciales (Calacalí, Pomasqui y San Antonio de Pichincha). Consultoría, EMAAPQ, Quito.
15. Gobierno de Pichincha. (2012). Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la Parroquia de San Antonio de Pichincha 2012-2015. Gobierno Autónomo Descentralizado de Parroquial de San Antonio de Pichincha. Quito: Consejo de Planificación Provincial.

**Recibido:** 23 de marzo de 2017.

**Aprobado:** 20 de abril de 2017.

# Biología para la producción y la vida



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



## REPORTE DE CASOS

# Ozonoterapia en patologías de columna: Revisión de casos

## Ozone therapy in diseases of spine: Review of cases

Danilo Ruiz Reyes<sup>1</sup>, María Elena Romo<sup>2</sup>

DOI. 10.21931/RB/2017.02.02.7

### RESUMEN

El objetivo de esta revisión de casos clínicos, es demostrar el beneficio de la Ozonoterapia en las lesiones de columna lumbar en casos de hernias discales y artrosis vertebral. Fueron seleccionados cuatro pacientes: Dos con hernias discales en la región lumbosacra y dos con artrosis vertebral lumbar y daño del disco vertebral (discartrosis) en la misma región lumbar, atendidos en el Centro Médico Ozonocenter de Quito, Ecuador, en el segundo semestre 2016. Los pacientes presentaron signos clínicos característicos de esta patología: dolor lumbar, dolor región glútea, dolor lumbar a la deambulación, dolor al permanecer sentado por largos períodos. Estudios de Resonancia Magnética (MRI) de la región lumbo-sacra se utilizaron para corroborar la presencia, el tamaño y tipo de las lesiones antes y al concluir la terapia. En los cuatro pacientes se obtuvo una mejoría notable tanto en el tamaño de las protrusiones discales como en las lesiones artrósicas vertebrales. Se efectuó un seguimiento mensual a los pacientes durante seis meses, permaneciendo asintomáticos durante ese período. Se puede concluir que la ozonoterapia paravertebral constituye un excelente procedimiento médico para la resolución de las hernias discales y lesiones discartrósicas en la región lumbosacra.

**Palabras Claves:** hernias discales, discartrosis, ozonoterapia, protrusiones, región lumbo-sacra, resonancia magnética (MRI).

### ABSTRACT

The objective of this revision of clinical cases is to demonstrate the therapeutic effectiveness of ozone therapy in cases of hernial discs and arthrosis vertebral in the lumbar sacral region. A total of 4 patients were collected: Two diagnosed with lumbar disc herniation; and two with discartrosis in the lumbar sacral region, in Ozonocenter Medical Center of Quito, Ecuador, in the second half 2016. The patients have a clinically signs of the disease: Lumbar pain, gluteal pain, lumbar pain at walking, pain of stay seat for large periods of time. Nuclear magnetic resonance studies (MRI) of lumbar sacral region were used to corroborate the presence, type and size of the illness before and after the treatment. In the four patients, we have reduction of the size of protrusions discs and improve of discartrosis. Is made a follow-up to those patients monthly during six months, remaining asymptomatic during that period. In conclusion, ozone therapy is an excellent medical procedure for the resolutions of disc protrusions and discartrosis in the lumbar sacral level.

**Key Words:** disc herniation, lumbar sacral region, discartrosis, ozone therapy, protrusions, nuclear magnetic resonance (MRI).

### Introducción

El ozono (O<sub>3</sub>) es un oxígeno trivalente utilizado para la salud humana desde 1840, se lo obtiene por el paso de oxígeno medicinal por una descarga eléctrica de alto voltaje. Esta reacción realizada por un equipo especial de electromedicina produce un gas/plasma (ozono) con distintas concentraciones acordes a la patología y al tratamiento.

La utilización del Ozono en el tratamiento de las hernias de disco lumbares y cervicales protruidas y prolapsadas, igualmente en los procesos discartrósicos de columna, evidencia un gran beneficio, la regresión de la sintomatología dolorosa es rápida y las ventajas respecto a los métodos tradicionales, incluida la cirugía, están representadas por su eficacia y la ausencia de efectos colaterales.

La Hernia de Disco intervertebral lumbo sacra en sus diferentes fases representa un 5% de la patología de

la columna vertebral siendo la principal causa de lumbalgia o lumbociatalgia a nivel mundial y un motivo frecuente de incapacidad laboral.

### Los efectos del Ozono en estas patologías son:

Acelera la degradación de poliglucósidos en el núcleo pulposo del disco intervertebral lo que lleva a su reabsorción, con la consiguiente reducción del material herniado responsable de la compresión nerviosa.

Elimina los mediadores químicos de la inflamación (Fosfolipasa A2, Metaloproteinasas, Prostaglandina E2, IL6, Glicoproteína YKL-40) que se liberan con la ruptura del núcleo pulposo del disco lesionado y que producen inflamación, contracción muscular, falta de irrigación (hipoxia tisular, isquemia y acidosis), edema local, desmielinización y estímulo nociceptivo (dolor).

Estimula la acción del Factor de Crecimiento Transformante/Tisular (TGF-β) favoreciendo la regeneración de los tejidos.

<sup>1</sup> Director Médico Ozonocenter, Quito, Ecuador; Docente Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica, Quito, Ecuador.

<sup>2</sup> Médico, Ozonocenter, Quito, Ecuador.

Correspondence: druizr82@gmail.com

## Introducción

El ozono (O<sub>3</sub>) es un oxígeno trivalente utilizado para la salud humana desde 1840, se lo obtiene por el paso de oxígeno medicinal por una descarga eléctrica de alto voltaje. Esta reacción realizada por un equipo especial de electromedicina produce un gas/plasma (ozono) con distintas concentraciones acordes a la patología y al tratamiento.

La utilización del Ozono en el tratamiento de las hernias de disco lumbares y cervicales protruidas y prolapsadas, igualmente en los procesos discartrósicos de columna, evidencia un gran beneficio, la regresión de la sintomatología dolorosa es rápida y las ventajas respecto a los métodos tradicionales, incluida la cirugía, están representadas por su eficacia y la ausencia de efectos colaterales.

La Hernia de Disco intervertebral lumbo sacra en sus diferentes fases representa un 5% de la patología de la columna vertebral siendo la principal causa de lumbalgia o lumbociatalgia a nivel mundial y un motivo frecuente de incapacidad laboral.

### Los efectos del Ozono en estas patologías son:

Acelera la degradación de poliglucósidos en el núcleo pulposo del disco intervertebral lo que lleva a su reabsorción, con la consiguiente reducción del material herniado responsable de la compresión nerviosa.

Elimina los mediadores químicos de la inflamación (Fosfolipasa A2, Metaloproteinasas, Prostaglandina E2, IL6, Glicoproteína YKL-40) que se liberan con la ruptura del núcleo pulposo del disco lesionado y que producen inflamación, contracción muscular, falta de irrigación (hipoxia tisular, isquemia y acidosis), edema local, desmielinización y estímulo nociceptivo (dolor).

Estimula la acción del Factor de Crecimiento Transformante/Tisular (TGF-β) favoreciendo la regeneración de los tejidos.

Aumenta la capacidad de la sangre de absorber y transportar oxígeno (hiperoxigenación) mejorando la micro circulación y las funciones celulares. Disminuye el edema a ese nivel.

Regula el balance Redox celular, neutralizando los radicales libres de oxígeno y facilitando la eliminación de toxinas.

Produce estímulo hormonal: (Cortisol, serotonina, endorfinas) produciendo una franca sensación de bienestar.

Según últimas investigaciones en el área, el sistema inmunológico es modulado por la ozonoterapia y de esa forma, reabsorbe la porción herniada del núcleo pulposo, restituyendo la integridad del anillo fibroso y terminando con la inflamación y el dolor<sup>1-5</sup>.

## MATERIALES Y METODOS

El presente estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Institución, cumplió con lo establecido en la Declaración de Helsinki, última versión correspondiente a la Asamblea General de Edimburgo, Escocia, de Octubre del 2000<sup>6</sup>.

Todos los pacientes fueron evaluados clínicamente y los diagnósticos fueron confirmados a través de estudios de Resonancia Magnética Nuclear simple (MRI). Los datos personales del paciente y del examen físico quedaron registrados en la Historia Clínica.

De inicio cada participante fue informado del tratamiento que iba a recibir, la forma de aplicación, los beneficios que le proporcionaría, los cuidados a tener en cuenta, las molestias que le podía ocasionar el tratamiento, para lo cual cada uno dio su consentimiento informado. El personal médico que participó en el estudio tiene experiencia clínica y fue entrenado en el manejo y evaluación de los pacientes y la aplicación del tratamiento.

**En todos los pacientes se utilizó la siguiente técnica:**

Previa desinfección del área, se efectuó una infiltración del compartimento del psoas o espacio de Bonitot, con 15 cc de ozono a una concentración de 20 ug/cc, a 4 cm de la apófisis espinosa a nivel de la línea intercrestas ilíacas o línea de Tuffier que se corresponde con la vértebra L4, siguiendo la técnica de Capdevilla o Nizora modificado, definiendo el lado a infiltrar en base a la localización del dolor lumbar o lumbociático y/o parestesias en el miembro inferior en caso de radiculopatía, Para el efecto se utilizaron agujas muy finas No. 22 x 7 cm<sup>7</sup>.

En el lado contralateral, se efectuó una infiltración de 10 cc de ozono a una concentración de 20 ug/cc, en la musculatura paravertebral, a 2 cm de la apófisis espinosa, en localizaciones variables dependiendo de la ubicación del conflicto disco radicular. Para el efecto se utilizaron agujas No. 23 x 3,8 cm.

Previa a la infiltración se aplicó en los sitios predefinidos y premarcados, cloruro de etilo tópico (anestésico frío en aerosol) para minimizar el dolor producto de los pinchazos.

En todos los pacientes se utilizó un esquema de 10 sesiones, las primeras 5 sesiones en forma semanal y las siguientes en forma quincenal. En todos ellos a partir de la tercera sesión se adiciono fisioterapia lumbar especializada.

Estudios de Resonancia Magnética (MRI) de la región lumbo sacra se utilizaron para corroborar la evolución de las lesiones al concluir el tratamiento.

La mezcla de O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> fue obtenida a partir de oxígeno médico utilizando un generador de ozono marca Bioline BL-X5. Todos los tratamientos fueron aplicados siguiendo lo establecido en la Declaración de Madrid 2015 sobre Ozonoterapia<sup>8</sup>.

### Caso 1

Paciente sexo femenino de 42 años, profesión médico. Acude por presentar dolor en zona lumbar que se incrementa al permanecer de pie y con la deambulación ante el ejercicio profesional, el dolor en las noches se torna incapacitante. Al examen físico dolor a la digito presión intervertebral lumbar (signo de Delitala), dolor en articulaciones sacro ilíacas. No hay signos de compresión radicular. Desde la segunda sesión de ozonoterapia la sintomatología fue disminuyendo progresivamente, desapareciendo completamente y manteniéndose en el tiempo. La imagen de MRI post tratamiento demostró una completa reducción de las protrusiones discales en L4/L5 y L5/S1. (Figuras 1 y 2)

### Caso 2

Paciente sexo masculino, de 25 años de edad, estudiante. Acude presentando intenso dolor lumbar con irradiación hacia miembro inferior izquierdo, asociado a parestesias que llegaban hasta dedos de pies. Al examen físico hay dolor lumbar con los movimientos. Lasegue izquierdo positivo, reflejo patelar disminuido, prueba Semmes Weinstein (monofilamento) positiva pie izquierdo. La sintomatología dolorosa fue disminuyendo a partir de la cuarta sesión, para luego desaparecer manteniéndose en los controles posteriores, igualmente a partir de la sexta sesión se evidenció una recuperación de la sensibilidad táctil en su pie izquierdo, mejorando la deambulación. La MRI de control efectuada al terminar la terapia evidenció una reducción importante de las hernias discales L4/L5 y L5/S1. (Figuras 3, 4)

### Caso 3

Paciente sexo femenino de 49 años de edad, ama de casa. Con antecedentes de dolor lumbar por varios años, diagnosticada de hernias discales hace 3 años. Acude a la consulta presentado dolor lumbar intenso, que se incrementa al levantarse de la cama por las mañanas y al estar de pie o sentada por mucho tiempo. La flexión lumbar acentúa el dolor. Al examen físico se evidencia una paciente con facies dolorosa, quejumbrosa. Dolor a la presión en toda la región lumbar, hay Lasegue derecho. La prueba de Monofilamento es negativa en ambos pies. La paciente fue presentando mejoría paulatina de su dolor, tornándose asintomática



Figura 1: MRI pre tratamiento caso 1



Figura 2: MRI post tratamiento caso 1



Figura 3: MRI pre tratamiento caso 2



Figura 4: MRI post tratamiento caso 2



Figura 5: MRI pre tratamiento caso 3

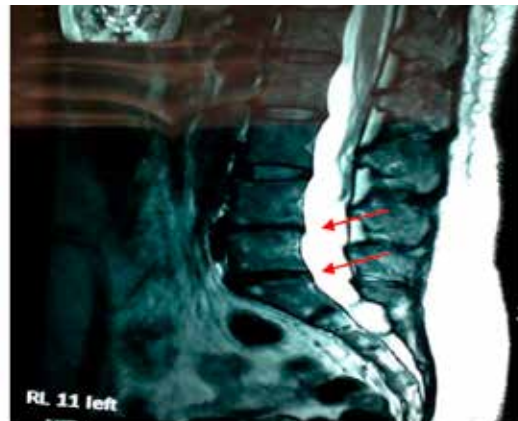


Figura 6: MRI post tratamiento caso 3



Figura 7: MRI pre tratamiento caso 4



Figura 8: MRI post tratamiento caso 4

en los controles posteriores, los estudios de MRI post tratamiento demostraron una mejoría significativa en sus lesiones discartróicas, incluso con regeneración del disco vertebral L4/L5, resolución de los nódulos de Schmörl y de la protrusión discal L5/S1. (Figuras 5,6)

#### Caso 4

Paciente sexo masculino, 60 años de edad, profesión abogado. Presenta dolor lumbar importante especialmente con actividad deportiva (trote), que se irradia a miembro inferior izquierdo lo cual limita sus actividades cotidianas. Al examen físico dolor lumbar intervertebral, Lasegue izquierdo, prueba monofilamento en ambos pies negativa. Al concluir la terapia en la MRI se hace evidente una mejoría prácticamente absoluta del fenómeno discartróico y el paciente permanece asintomático en el tiempo, retornando a sus labores cotidianas. (Figuras 7,8)

## RESULTADOS

Los resultados de la terapia se valoraron comparando la Resonancia Magnética simple obtenida antes y luego de concluir el tratamiento. No se evidencio efectos indeseables en ninguno de los pacientes. En todos se obtuvo mejoría de su sintomatología en forma progresiva e individualizada, permaneciendo asintomáticos luego de seis meses de concluir los tratamientos.

## DISCUSIÓN

En los últimos años la ozonoterapia como método terapéutico efectivo ha obtenido un gran desarrollo y difusión, siendo reconocida y utilizada en varios países a nivel mundial. En la actualidad existen más de 40 asociaciones nacionales e internacionales que agrupan a los profesionales que practican esta terapia. Uno de los logros más recientes para unificar los criterios en cuanto a métodos y procedimientos a seguir, fueron recogidos en la "Declaración de Madrid sobre la Ozonoterapia", firmado en Madrid, España (junio de 2015) durante el Encuentro Internacional de Escuelas de Ozonoterapia. En la actualidad es el único documento global existente sobre la ozonoterapia y sus recomendaciones son aplicadas en diferentes lugares del mundo<sup>8,9</sup>.

Las hernias discales en diferentes sectores de la columna se considera como la patología que ocasiona el mayor índice de ausentismo laboral, se calcula que 8 de cada 10 personas sufrirá a lo largo de su vida algún episodio de dolor lumbar debido a esta patología<sup>10</sup>.

El tratamiento con Ozono, es una novedosa terapia de gran utilidad en múltiples patologías, siendo las discopatías (hernias discales) una de las entidades en donde se ha evidenciado mayor utilidad, especialmente a nivel de la columna lumbar, técnica que se fundamenta en la administración de ozono en la musculatura paravertebral contigua al sitio de la lesión y/o en la emergencia de las raíces nerviosas de los nervios raquídeos que formarán el nervio ciático, infiltrando el compartimiento del psoas o espacio de Bonitot, siguiendo la técnica de Capdevilla o Nizora modificado, con lo cual se logra bloquear y reducir el dolor y la sintomatología propia del padecimiento, producto de la compresión (identación) raquímedular o de raíces nerviosas, reduciendo el material herniado por mecanismos ya explicados anteriormente, cesando el efecto mecánico compresivo<sup>7,11-14</sup>.

Los efectos del ozono inyectado en la musculatura paravertebral han sido estudiados y respaldados por varios estudios fisiológicos efectuados en Italia por el Dr. Velio Bocci y por otros investigadores en el área<sup>2,15,16</sup>.

La ozonoterapia como tratamiento de las hernias discales es una técnica cuyos resultados son similares o incluso superiores a los obtenidos mediante cirugía, con los cuales se han obtenido resultados favorables que fluctúan entre 20 al 60 % y que muchas

veces dejan graves secuelas (fibrosis postquirúrgica, fistulas de líquido cefalorraquídeo, riesgo anestésico).

Un meta-análisis reciente demuestra que la ozonoterapia es tan eficaz como la cirugía, pero con un índice mucho menor de eventos adversos y también enormes ventajas en cuanto a costos<sup>17</sup>.

Actualmente es una de las mejores opciones para el tratamiento del dolor en hernias discales, tiene la ventaja de ser un tratamiento ambulatorio, los beneficios son duraderos y no se han descrito efectos adversos con la técnica empleada, siempre que se realice correctamente y en los casos que se justifique<sup>18-23</sup>.

El ozono en hernias discales puede ser utilizado en conjunción con otros medicamentos y/o tratamientos buscando mejores beneficios para los pacientes<sup>24-26</sup>.

Estadísticamente, a nivel internacional, el índice de mejoría es de un 80%, siendo únicamente un 20 % en los que no se obtienen resultados positivos, en estos casos se recurre a tratamientos complementarios que se determinaran en cada caso<sup>27,28</sup>.

Igualmente se han descrito técnicas de discolisis con ozono, las cuales deben ser efectuadas en quirófano y con el apoyo de sedación y equipos de fluoroscopia para guiar las agujas de punción, esta técnica a más de incrementar los costos, no supera en beneficios a la técnica de infiltración de ozono paravertebral<sup>29</sup>.

En un Meta análisis efectuado por Steppan J. et al 2010, en el cual realiza un estudio comparativo de varios trabajos efectuados utilizando ozono en hernias discales, se concluye que la técnica de ozonoterapia intradiscal o intraforaminal tiene un nivel de Evidencia II-3 (Evidencia obtenida por estudios diagnósticos son inciertos); mientras que la técnica de ozonoterapia paravertebral a nivel lesional tiene un nivel de evidencia II-1 (Evidencia es obtenida por estudios apropiadamente conducidos y de tamaño adecuado)<sup>17</sup>.

El análisis efectuado en nuestro Centro Médico ratifica los resultados observados por otros autores, en los cuales se han logrado remisiones en el tamaño de las protrusiones discales y de las lesiones discartróicas vertebrales, siendo lo más importante la remisión de la sintomatología en todos ellos.

En conclusión, la ozonoterapia paravertebral, constituye un excelente procedimiento médico, para las hernias discales y la discartrosis vertebral; proporcionado a los pacientes una mejor calidad de vida. Se necesitan más estudios sobre este tema para establecer protocolos de tratamiento que puedan ser aplicados con seguridad en otras instituciones.

## Referencias bibliográficas

1. Bocci V. Ozone a new medical drug. Springer. Vol. 53, Journal of Chemical Information and Modeling. Holanda; 2005. 1699 p.
2. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. Riv Ital di Ossigeno-Ozonoterapia. 2006;5(2):93-104
3. Schwartz A, Martínez-Sánchez G, Scwhartz A. La ozonoterapia y su fundamentación científica. Rev Española Ozonoterapia [Internet]. 2012;2(1):163-98. Available from: <http://revistaespaoladeozonoterapia.es/index.php/reo/article/view/23>
4. Travagli V, Zanardi I, Bocci V. A realistic evaluation of the action of ozone on whole human blood. Int J Biol Macromol. 2006;39(4-5):317-20.
5. Valdenassi L, Franzini M, Simonetti V, Ricevuti G. Oxygen-ozone therapy: paradoxical stimulation of ozone. Ozone Ther [Internet]. 2016;1(1):2. Available from: <http://www.pagepressjournals.org/index.php/ozone/article/view/5837>
6. Helsinki D. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Asoc Médica Mund [Internet]. 2000;1-8. Available from: [http://www.reumatologia.org.ar/userfiles/file/investigacion-farmacoclinica/inv\\_clinica\\_faltante.doc](http://www.reumatologia.org.ar/userfiles/file/investigacion-farmacoclinica/inv_clinica_faltante.doc)
7. Mejía G, Panoso A GA. Bloqueo del compartimiento del psoas. Rev Mex Anestesiol. 2010;33(1):31-8.
8. ICSCO3. Declaración de Madrid sobre la ozonoterapia 2015. 2nd ed. (International Scientific Committee of Ozone Therapy). Madrid, España: Grafox Imprenta, SL; 2015. 52 p.

9. Schwartz A, Mariño RQ. La Ozonoterapia frente a la Legislación: Hacia un análisis global de derecho comparado. *Rev Española Ozonoterapia*. 2008;1-41.
10. Gregory DS, Seto CK, Wortley GC, Shugart CM. Acute lumbar disk pain: Navigating evaluation and treatment choices. *Am Fam Physician*. 2008;78(7).
11. Viebahn R. El uso del ozono en medicina. [Internet]. Vol. Cuarta edi. Munich, Alemania; 2007. 156 p. Available from: <http://es.slideshare.net/andregalletakora/el-uso-del-ozono-en-medicina>.
12. Stockburger D, Del H, Del USO, En O, Medicina L a, Usos PY. Terapia con ozono. Ateramex, editor. Alicante, España; 2008. 83 p.
13. Benavides G. Manejo de la hernia discal lumbar con ozonoterapia paravertebral y epidural: reporte de un caso. *Rev Española Ozonoterapia*. 2015;5(1):33-8.
14. Paoloni M, Sante L Di, Cacchio A, Apuzzo D, Marotta S, Razzano M, et al. Intramuscular Oxygen-Ozone Therapy in the Treatment of Acute Back Pain With Lumbar Disc Herniation. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(13):1337-44.
15. Bocci V, Borrelli E, Zanardi I, Travagli V. The usefulness of ozone treatment in spinal pain. *Drug Des Devel Ther [Internet]*. 2015 Jan 15 [cited 2016 Sep 22];9:2677-85. Available from: <https://www.dovepress.com/the-usefulness-of-ozone-treatment-in-spinal-pain-peer-reviewed-fulltext-article-DDDT>
16. Borrelli E. Mechanism of Action of Oxygen Ozone Therapy in the Treatment of Disc Herniation and Low Back Pain. *Acta Neurochir (Wien)*. 2011;108:123-5.
17. Steppan J, Meaders T, Muto M, Murphy KJ. A Metaanalysis of the Effectiveness and Safety of Ozone Treatments for Herniated Lumbar Discs. *J Vasc Interv Radiol*. 2010;
18. Hidalgo-Tallón FJ, Torres LM. Ozonoterapia en medicina del dolor. Revisión. *Rev Soc Esp Dolor Revisión Rev Soc Esp Dolor*. 2013;20(206):291-300.
19. Jimenez, S; Toro, M; Baiz, C.Soc R, Dolor E. Eficacia de la infiltración de ozono paravertebral lumbar y en puntos gatillos como coadyuvante del tratamiento en pacientes con dolor lumbar crónico y lumbociatalgia crónica en el síndrome doloroso miofascial aislado o acompañado de otras patologías. *Rev Soc Española del Dolor*. 2014;21(1):23-38.
20. Canovas, L. Alonso, M. Couñago, S. Rojas JOAH. Alivio Del Dolor Discogénico : Experiencia En 51 Casos. *Rev Soc Española del Dolor*. 2015;22(1):27-31.
21. Lu, W; Li, YH; margin of the facet joint. 2010;2(3):109-12.
22. Magalhaes FNDO, Dotta L, Sasse A, Teixeira MJ, Fonoff ET. Ozone therapy as a treatment for low back pain secondary to herniated disc: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pain Physician [Internet]*. 2012;15(2):E115-29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22430658>
23. Rosato ML, Mainini M, Luongo M, Mascolo L, Mattera S, Schiaffino L. Oxygen-ozone therapy : our experience in the treatment of hard-root conflicts m er ci u s e o n m er o n al. 2016;1:1-2.
24. Schwartz A. Ozono y factores de crecimiento ozonizados en el tratamiento de la hernia discal y discartrosis de la columna lumbar. *Rev Española Ozonoterapia*. 2013;3:7-19.
25. Ovando E, Luis J, García S, Leonardo L, Ortiz A. Reporte de 147 casos de éxito en el Centro de la Columna. *Rev Mex Med Física y Rehabil*. 2014;26(1):24-37.
26. Herrera, M; Valenzuela, L; Alvarez J. Ozonoterapia y magnetoterapia en pacientes con hernias discales. *Medisan*. 2016;20(6):826-32.
27. Zambello A, Fara B, Tabaracci G, Bianchi M. Epidural Steroid Injection vs Paravertebral O 2 O 3 Infiltration for Symptomatic Herniated Disc Refractory to Conventional Treatment A Prospective Randomized Study. *Riv Ital di Ossigeno-Ozonoterapia*. 2006;3(5):123-7.
28. Gallucci M, Limbucci N, Zugaro L, Barile A, Galzio R. Sciatica : Treatment with Intradiscal and Intraforaminal Injections of Steroid and Oxygen-Ozone versus Steroid Only 1 Purpose : Methods : Results : Conclusion : Radiology. 2007;242(3):907-13.
29. Bonetti M, Fontana A, Cotticelli B, Dalla Volta G, Guindani M, Leonardi M. Intraforaminal O2-O3 versus periradicular steroidal infiltrations in lower back pain: Randomized controlled study. *Am J Neuroradiol*. 2005;26(5):996-1000.

**Recibido:** 12 de abril de 2017.

**Aprobado:** 14 de mayo de 2017.

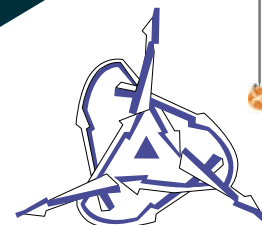


# BIOMOL®

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.



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.

## ARTÍCULO DE REVISIÓN

## Estrategias Naturales para Mejorar el Crecimiento y la Salud en los Cultivos Masivos de Camarón en Ecuador

### Natural strategies to Improve Growth and Health in Massive Shrimp Cultures in Ecuador

Luis E. Trujillo<sup>1\*</sup>, Leonor Rivera<sup>2,3</sup>, Eugenio Hardy<sup>1,4</sup>, Erika M. Llumiquina<sup>1</sup>, Francisco Garrido<sup>1</sup>, Jesús A. Chávez<sup>3</sup>, Víctor H. Abril<sup>1</sup>, José M. País-Chanfrau<sup>5</sup>

DOI. 10.21931/RB/2017.02.02.8

## RESUMEN

El camarón, es actualmente el segundo producto comercial no petrolero más grande de Ecuador, debe cultivarse preferentemente con productos orgánicos naturales que no sean productos químicos sintéticos o antibióticos. Por lo tanto, los probióticos, los prebióticos y los inmunoestimuladores tales como los lipopolisacáridos (LPSs) actualmente atraen gran atención para el cultivo de camarón, la gestión de la calidad del agua y el tratamiento de enfermedades acuáticas. De hecho, en diferentes países, los probióticos basados en bacterias, levaduras o sus componentes se han utilizado con éxito en esta práctica. También se sugiere ampliamente el uso de prebióticos como aditivos alimentarios para camarones. Por otra parte, se conoce que los lipopolisacáridos, que son el componente principal de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, ejercen fuertes efectos sobre el sistema inmune del camarón. La presente revisión destaca el uso de estas importantes entidades biológicas como potenciales candidatos a ser utilizados en la acuicultura ecuatoriana. A pesar de que una gran variedad de efectos positivos de los probióticos, prebióticos y LPSs en peces y crustáceos han sido descubiertos, aún se necesita más información para aclarar y prever el impacto molecular de estas entidades biológicas en camarones.

**Palabras Claves:** Prebióticos, probióticos, fructoligosacáridos, lipopolisacáridos, camarón, levadura.

## ABSTRACT

Shrimp, which is currently the second largest non-oil commercial product from Ecuador, should be preferably cultivated with natural organic products other than synthetic chemicals or antibiotics. Therefore, probiotics, prebiotics and immunostimulators such as lipopolysaccharides currently attract great attention for shrimp culturing, water quality management and treating aquatic diseases. In fact, probiotics based on either bacterium, yeasts or its components have been used successfully in practice. Also, the use of prebiotics as food additives for shrimps is extensively suggested. Lipopolysaccharides, which are the major component of the outer membrane of gram-negative bacteria, are known to exert strong effects on the shrimp immune system. The present review highlights the use of these important biological entities as potential candidates to be used in Ecuadorian shrimp aquaculture. Despite a variety of positive effects of probiotic, prebiotic and LPS supplements on fish and crustaceans have been uncovered, significantly more information is still required in order to clarify and foresee the molecular impact of these biological entities in shrimps.

**Key Words:** Prebiotic, probiotic, fructoligosaccharides, lipopolysaccharide, shrimp, yeasts.

### Introducción

A finales de 1996, Ecuador se convirtió en el segundo mayor exportador mundial de camarones<sup>1</sup>. En la actualidad, el camarón es el segundo producto no petrolero que comercialmente más aporta a la economía después de los bananos en Ecuador. Durante 2013, por ejemplo, 474 236 libras de camarón fueron exportadas fuera de Ecuador, lo que equivale a 1 620 millones de dólares. En 2014, se exportaron medio millón de libras de camarón, generando un ingreso de 1 520 millones de dólares. La producción de camarón sigue creciendo de manera constante como se muestra en la figura 1, por lo que se espera que sus exportaciones superen los

valores previos a fines de este año. Cabe destacar que Ecuador sigue siendo el mayor productor latinoamericano y el quinto productor mundial de camarones de cultivo<sup>2</sup>. En consecuencia, la cría de camarón conduce a un mayor intercambio de divisas y una mayor fuente de mano de obra en este país.

La producción masiva de camarones no está exenta de riesgos. De hecho, la aparición del virus de mancha blanca y otros brotes de enfermedades en el siglo pasado han causado una disminución en la producción de camarón, afectando así social y económicamente al país<sup>3</sup>. Otros problemas recientes asociados con el cultivo intensivo de camarón son una disminución del agua<sup>4</sup> y la calidad de los alimentos, un aumento del

<sup>1</sup> Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Life science department. Industrial Biotechnology and Bioproducts Research Group, Center for Nanotechnology and Nanosciences CENCINAT, Quito, Pichincha, Ecuador.

<sup>2</sup> Universidad Técnica de Machala, Machala, El Oro, Ecuador.

<sup>3</sup> Unidad de Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos-Perú.

<sup>4</sup> Biotechnology Laboratory, Study Center for Research and Biological Evaluations, Institute of Pharmacy and Foods, Havana University, Cuba.

<sup>5</sup> Universidad Técnica del Norte UTN. FICAYA. Ave. 17 julio 5-21, Ibarra 119, Imbabura, Ecuador.

**Correspondencia:** letrujillo3@espe.edu.ec (L.E. Trujillo)

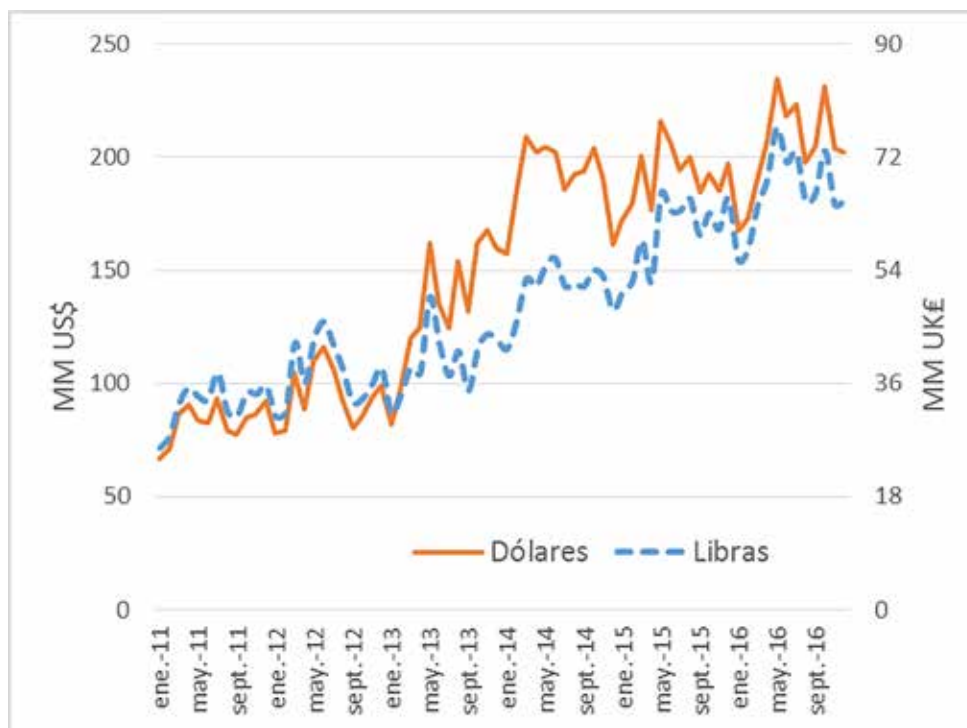


Figura 1: Exportación de camarones hasta finales de 2016 Vs Millones de dólares obtenidos <sup>2</sup>.

estrés animal y un aumento de infecciones bacterianas, virales o parasitarias.

Los antibióticos se han utilizado tradicionalmente para tratar las infecciones microbianas en la acuicultura en todo el mundo. Sin embargo, el uso y el abuso de antibióticos puede causar efectos adversos no deseados como la acumulación de antibióticos en los tejidos de los animales, supresión inmune, desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos y destrucción de la flora microbiana ambiental<sup>5,6</sup>. Por otro lado, el uso de antibióticos para el tratamiento de peces y camarones es costoso y, por consiguiente, no está disponible en muchas granjas ecuatorianas. Por lo tanto, las investigaciones encaminadas a la sustitución de antibióticos por productos naturales como los probióticos, los prebióticos y los lipopolisacáridos (LPS) han recibido recientemente una atención considerable por parte de los investigadores del camarón y de estos productores naturales alternativos en Ecuador. Este hecho asegura el desarrollo de diferentes bioprocesos para obtener estas moléculas en el país<sup>7,8</sup>.

El término probiótico significa “para la vida”, y se deriva de las palabras griegas “pro” y “bios”. La definición más amplia de probióticos fue formulada por Fuller<sup>10</sup> indicando que un probiótico es considerado como “un suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal”. Sin embargo, no sólo los microorganismos vivos deben ser considerados como probióticos, sino también cualquier microorganismo o cualquiera de sus componentes que puedan conferir cualquier efecto fisiológico beneficioso al huésped o al medio ambiente donde vive el microorganismo.

Un prebiótico, a diferencia de un probiótico, no es un organismo y por lo tanto tiene menos influencia en el medio ambiente natural. Basándose en la definición de Gibson y Roberfroid, los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles que afectan de manera beneficiosa al huésped al estimular selectivamente el crecimiento y / o la actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon y así mejorar la salud del huésped<sup>11,12</sup>. Los prebióticos tienen dos características principales, la primera es que son alimentos naturales, y la segunda es que no son organismos vivos, por lo que este hecho constituye una ventaja sobre los probióticos.

La incorporación de prebióticos en la dieta no necesita autorización como aditivos alimentarios ya que están bien descritos

en la literatura. Originalmente, los prebióticos se utilizaron para estimular bifidobacterias y lactobacilos en la microbiota humana<sup>13</sup>.

Los lipopolisacáridos inducen efectos fuertes en el sistema inmune del camarón. Estos efectos han sido también objeto de numerosos artículos (véase más adelante) en los que se presentan casos interesantes como evidencia de la posible aplicación de LPS como inmunoestimulante en la cría de camarón.

La presente revisión destaca el uso de probióticos, prebióticos y LPS, mecanismos de acción y retos futuros en el uso y producción de estas moléculas en la acuicultura ecuatoriana a base de experiencias nacionales e internacionales.

## LOS PROBIÓTICOS EN LA ACUICULTURA

Los probióticos son formulaciones microbianas cultivadas que se mezclan con enzimas y cereales fermentados unidos a un sustrato o formulación de uso en acuicultura<sup>14</sup>. En el campo de los organismos acuáticos, los probióticos se han definido como “células microbianas capaces de viajar a través del tracto gastrointestinal y de mantenerse vivas, con el objetivo de mejorar la salud”<sup>15,16</sup>. Una definición más amplia postula que “los probióticos se definen como entes vivos o muertos, o incluso un componente de los microorganismos que actúan bajo diferentes modos de acción al conferir efectos beneficiosos no sólo al huésped sino también a su medio ambiente”.

Existe un interés creciente por los probióticos<sup>17</sup> que ha sido estimulado por varios factores, entre ellos: 1) resultados científicos y clínicos interesantes utilizando organismos probióticos bien documentados; 2) inquietudes sobre efectos secundarios y daños ambientales; Para el uso de productos naturales, y (4) el desarrollo de interesantes antagonistas acuáticos para la acuicultura ecológica. La Tabla 1 muestra cepas microbianas probadas con éxito como probióticos en condiciones de campo.

Los probióticos funcionan de acuerdo con mecanismos de exclusión competitiva por los cuales los patógenos son reemplazados o excluidos por el desarrollo de una población microbiana beneficiosa en la superficie intestinal, lo que reduce las incidencias de la enfermedad, mejor salud y mejor crecimiento del huésped (Fig.2). Las cepas bacterianas, de levadura o sus componentes son capaces de producir sustancias inhibitoras que podrían interactuar directamente con patógenos bacterianos y virales. El

Cepa probiótica	Beneficio	Modo de aplicación	Referencia
<i>Bacillus cereus</i>	Control de concentración de vibrio.	En el agua	18
<i>Bacillus licheniformis</i>	Competir con otras bacterias en la acumulación y limpieza de la materia orgánica.	En el agua	19
<i>Bacillus subtilis</i>	Contra la infección con <i>Vibrio harveyi</i> 639.	Adición al agua	20
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Inmunoestimulación y protección contra <i>Vibrio harveyi</i>	En la dieta	21
<i>Streptococcus sp.</i>	Antagonista con <i>Vibrio alginolyticus</i>	En la dieta	22
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Control de la infección con <i>Vibrio alginolyticus</i>	En la dieta	23

Tabla 1: Cepas microbianas autorizadas y probadas utilizadas como probióticos en condiciones de campo.

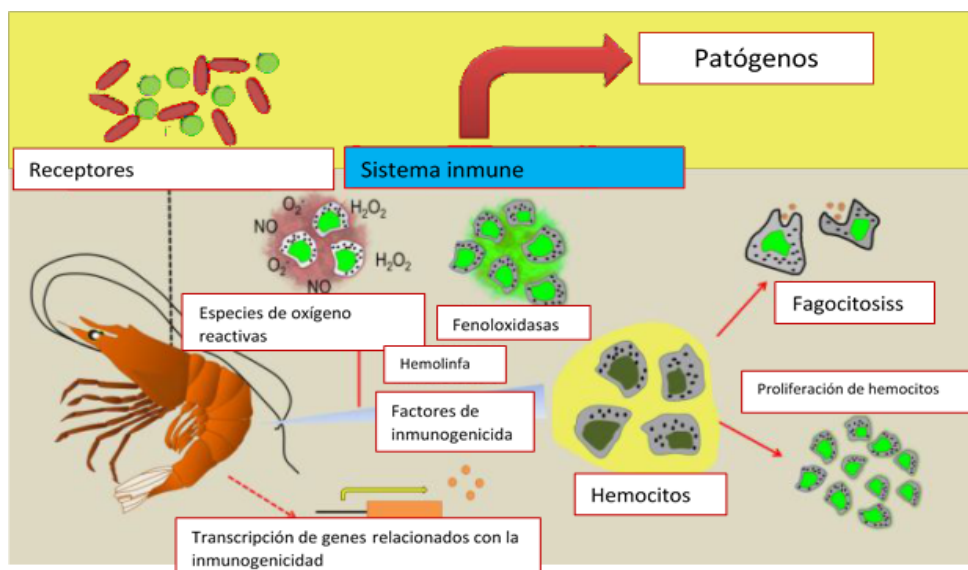


Figura 2: Como actúan los probióticos en el camarón<sup>83</sup>. La inhibición directa de patógenos mediante la modulación del sistema inmune del camarón, la producción de sustancias inhibidoras que podrían interactuar directamente con patógenos y también son capaces de manipular la microflora y las condiciones físico-químicas del ecosistema del estanque.

crecimiento de estos patógenos se evita a través de la producción de metabolitos antagonistas<sup>24-26</sup> o por interferencia de adhesión<sup>27</sup>.

Algunos de los estudios previos realizados en los primeros 90 años del siglo pasado, reportados por Nogami y Maeda<sup>28</sup>, y Rengpipat et al.<sup>29</sup> mostraron un mejor crecimiento y supervivencia de crustáceos (camarones, cangrejos) con suplementos probióticos.

Algunos informes internacionales y nacionales describen un aumento significativo en el peso de camarones tratados con probióticos sobre el grupo no tratado a nivel de finca<sup>30</sup> como se muestra en la Tabla 2.

Lara-Flores et al.<sup>31</sup> explicó que las bacterias probióticas son buenos candidatos para aumentar la digestión de nutrientes y el crecimiento en organismos acuáticos. Irianto y Austin<sup>32</sup> afirmaron que los compuestos nocivos en la dieta pueden ser destoxificados por la acción de enzimas hidrolíticas tales como amilasas y proteasas, y también que los nutrientes en los organismos podrían ser mejorados por vitaminas como por ejemplo, biotina y vitamina B12. Las enzimas digestivas son necesarias para romper los compuestos complejos en moléculas más simples y absorbibles que podrían ser utilizadas por el huésped<sup>33</sup>. Por lo tanto, la suplementación dietética con probióticos aumenta el crecimiento<sup>34</sup> a través de la contribución enzimática que aumenta la digestibilidad<sup>35</sup>. Los constituyentes de la digestión de proteínas gene-

rados por la acción de enzimas proteolíticas endógenas también contribuyen a aumentar la digestibilidad de los piensos asociados con la administración de probióticos<sup>35</sup>.

Se han propuesto probióticos para mejorar la respuesta inmune de los camarones. De hecho, la bacteria probiótica *Lactobacillus plantarum* mejora la expresión génica y las respuestas inmunes en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, cuando se combina en su dieta. Específicamente, *L. plantarum* mejora la actividad de la fenoloxidasas, la profenoloxidasas (proPO) y la superóxido dismutasa (SOD), junto con la tasa de supervivencia después de la estimulación con *V. alginolyticus*. Estos efectos se observan cuando las bacterias se dan en la dieta a  $10^{10}$  ufc/kg durante 168 horas<sup>36</sup>.

*L. plantarum* tiene una gran efectividad contra *Vibrio harveyi*. Desafíos experimentales *in vivo*, muestra que *Litopenaeus vannamei* aumentó la resistencia en comparación con un grupo control no expuesto a *V. harveyi*. Estos resultados han sugerido que la cepa probiótica tiene un efecto inmuno-reactivo sobre el huésped, posiblemente relacionado con compuestos extracelulares liberados de bacterias que pueden estimular respuestas inmunes inespecíficas. La actividad de *L. plantarum* es responsable del aumento del recuento total de hemocitos y de la actividad PO. De acuerdo con los resultados de esta investigación, se sugirió que la actividad aglutinante es la causa principal relacionada con la

Parámetros calculados	Tanques tratados con Probióticos (g)	Tanques no tratados con probióticos (g)
Peso inicial	126.6 ± 1.1	127 ± 1
Peso final	160.7 ± 3.4	309 ± 2.3
Ganancia de peso	234.1 ± 2.6	182 ± 1.3
Promedio peso inicial	4.22 ± 0.11	4.23 ± 0.03
Promedio peso final	12.02 ± 0.35	10.3 ± 0.05
Promedio de peso ganado	7.8 g ± 0.09	6.07 ± 0.02
Supervivencia	100%	100%

**Tabla 2:** Datos experimentales obtenidos en tanques de cultivo de camarón *P. monodon* tratados y no tratados con probióticos.

eliminación más efectiva de la hemolinfa y hepatopaneas por el camarón alimentado con la dieta suplementada con probiótico<sup>37</sup>.

Cuando se desafió con *Vibrio nigripulchritudo*, el probiótico *Pediococcus acidilactici* influyó en las defensas antioxidantes y el estrés oxidativo de *Litopenaeus vannamei*<sup>38</sup>. Este probiótico muestra eficacia en marcadores de defensa antioxidantes como SOD, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión y daño tisular. Esta cepa fue eficiente en el mantenimiento de los niveles de defensa antioxidante durante un período más largo que el control y los grupos de camarones no infectados<sup>39</sup>.

Entre las tres cepas, *Bacillus* P64 muestra un índice de inmunidad significativamente mayor y una respuesta inmune similar a la de *V. alginolyticus*. Además, el *Bacillus* P64 induce un aumento en la población de células hialinas<sup>40,41</sup>.

Algunos otros *Vibrio sp.* que han sido probados por su actividad probiótica en *L. vannamei* son *V. alginolyticus* (NCIMB 1339) y *V. gazogenes* (NCIMB 2250). Estas cepas muestran actividad antagonista contra los patógenos del camarón. Cuando los camarones juveniles son alimentados con quitina y *V. gazogenes*, el número de bacterias tipo vibrio en la tripa anterior y posterior disminuye significativamente y el número de hemocitos cambia significativamente. El cambio en el número de hemocitos probablemente refleja el estado inmunológico del camarón debido a que los hemocitos están involucrados tanto en defensas celulares como humorales del camarón<sup>42</sup>.

Los  $\beta$ -glucanos de levadura también se han aplicado como probióticos en la acuicultura para modular el sistema inmune innato de los peces y para mejorar la supervivencia de los peces frente a patógenos<sup>43,44</sup>. Si se administran como aditivos alimentarios, los  $\beta$ -glucanos pueden ejercer sus efectos primarios a través de la inducción de citoquinas, que a su vez afectan a la respuesta inmune sistémica en los peces. Se han evaluado diferentes fuentes de  $\beta$ -glucanos, aunque las fuentes más frecuentes son la levadura panadera, *Saccharomyces cerevisiae*. Algunas preparaciones comerciales de  $\beta$ -glucano que se pueden usar en acuicultura son MacroGard®, Betagard A®, EcoActiva™, Nutriferm™, BG y Fibosel®). Muchos estudios han explorado la respuesta in vitro de los macrófagos al  $\beta$ -glucano<sup>45</sup> mientras que otros estudios han abordado el efecto in vivo de  $\beta$ -glucanos en diferentes especies de peces<sup>46</sup>. Los  $\beta$ -glucanos de varias fuentes se han administrado a los peces por vía oral o intraperitoneal con diferentes efectos sobre la producción de anticuerpos, la expresión de genes del sistema inmune, la supervivencia, la resistencia a enfermedades infecciosas y la mejora en la resistencia al estrés. Se ha informado que algunos productos probióticos como Superbióticos, SuperPs, Zymetin y Mutagen desempeñan un papel vital en postlarvas de *P. monodon* manteniendo buenos parámetros de calidad del agua a lo largo del período de cultivo<sup>47</sup>. Pais-Chanfrau et al. 2016<sup>48</sup> modificaron el medio de cultivo para obtener grandes cantidades de biomasa de levadura para diferentes aplicaciones incluyendo la producción de  $\beta$ -glucanos para diferentes aplicaciones en cultivos masivos de camarón.

## LOS PREBIÓTICOS EN LA ACUICULTURA

Los prebióticos, a diferencia de los probióticos, no son organismos vivos por lo que tienen menos influencia en el medio ambiente. Mahious et al.<sup>49</sup>, Fooks et al.<sup>50</sup> y Gibson et al.<sup>12</sup> describieron que cualquier alimento que llega al colon por ejemplo, carbohidratos no digeribles, péptidos, proteínas y ciertos lípidos, puede ser un candidato a prebiótico. Sin embargo, los carbohidratos no digeribles como oligosacáridos, inulina, transgalactooligosacárido y lactulosa son considerados como el foco de la mayoría de los oligosacáridos<sup>12</sup>. En peces, los oligosacáridos de manano (MOS) y FOS son quizás los oligosacáridos más bien estudiados a pesar de la información sobre el uso de otros compuestos similares a oligosacáridos en animales acuáticos que también está disponible en la literatura<sup>51,52</sup>. La estructura química de algunos de estos oligosacáridos se presenta en la figura 2.

Bailey et al.<sup>53</sup> y otros autores<sup>54,55</sup> informaron que los prebióticos pueden modificar la comunidad microbiana del tracto gastrointestinal para potenciar las respuestas inmunes no específicas. La fermentación prebiótica en el colon por las bacterias causa una modificación significativa de la microflora colónica. De hecho, los oligosacáridos sirven como sustrato para el crecimiento y la proliferación de bacterias anaerobias, principalmente las bifidobacterias, que inhiben el crecimiento de bacterias putrefactivas y patógenas presentes en el colon<sup>56</sup>.

La producción resultante de sustancias que estimulan el sistema inmunológico aumenta la protección del huésped contra las infecciones. Li et al.<sup>57</sup> encontraron que la suplementación con FOS de cadena corta a concentraciones de 0,025 a 0,8% (m/m) aumenta la capacidad respiratoria de hemocitos en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* cultivado en un sistema con recirculación. La suplementación dietética de Grobiotic®-A mejora la supervivencia del camarón blanco del pacífico cultivado en agua de baja salinidad. Además, un desafío de agua dulce también muestra una mejora similar en la supervivencia del camarón alimentado con Grobiotic®-A, aunque no se han identificado los mecanismos para mejorar la supervivencia bajo condiciones de baja salinidad<sup>58</sup>.

Los prebióticos pueden modificar la comunidad microbiana del tracto gastrointestinal para mejorar las respuestas inmunes no específicas<sup>53</sup>. También ayudan a reducir el pH del intestino a través de la formación de ácidos grasos de cadena corta, lo que favorece las bacterias beneficiosas que bloquean la adhesión de los patógenos y los sitios de los receptores de toxinas, la competición de nutrientes y la estimulación del sistema inmunológico<sup>50,59,60</sup>.

Sin embargo, los informes sobre el efecto de los prebióticos sobre los parámetros de crecimiento en los peces no son concluyentes y algunos son contradictorios. La dieta de Beluga (*Huso huso*) suplementada con 1, 2 y 3% (m/m) de inulina ha afectado negativamente a una variedad de parámetros tales como aumento de peso, crecimiento, relación de eficiencia proteica, proteína y retención de energía, eficiencia alimentaria al suplementar con inulina. Además, los parámetros de crecimiento en los peces ali-

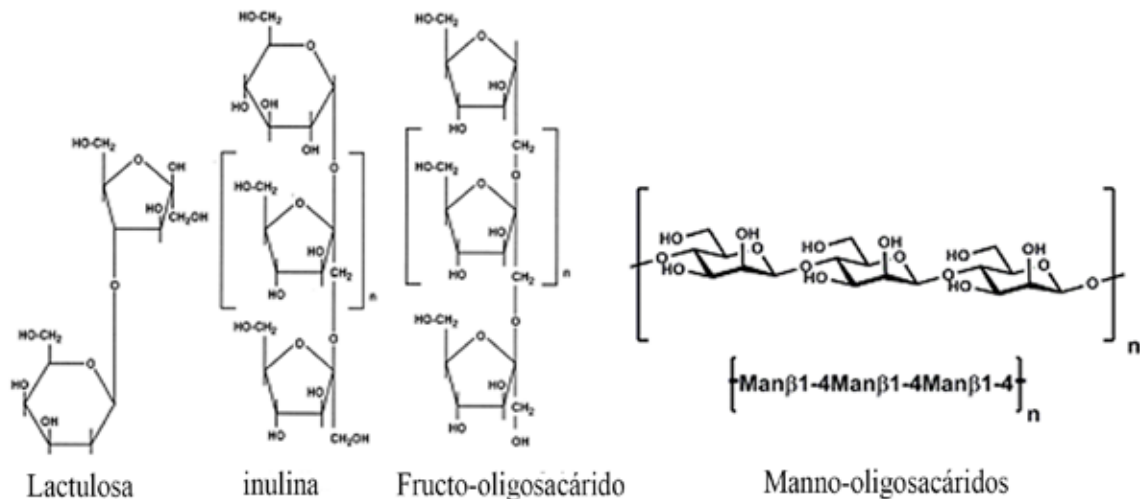


Figura 3: Estructura química de los fructo-oligosacáridos (FOS), la inulina, la lactulose y los manno-oligosacáridos (MOS).

mentados con inulina son inferiores a los mostrados en el grupo de control. La reducción de algunos de estos parámetros, especialmente el crecimiento, en los grupos tratados puede deberse al efecto de parámetros distintos de los relacionados con la inulina<sup>61</sup>. En cualquier caso, la inulina no ha mostrado efectos positivos en la tasa de crecimiento de los peces jóvenes *Huso huso*.

La dieta de salmón del Atlántico suplementada con 10 g/kg de prebióticos como MOS, FOS y galacto-oligosacárido (GOS) no mostró efectos sobre el crecimiento y la digestibilidad<sup>62</sup>. La eficacia de la alimentación mejora significativamente cuando se utiliza una dieta suplementada con 10-20 g/kg de Grobiotic®-AE durante 7 semanas, pero el crecimiento no es significativo<sup>63</sup>. Además, Refstie et al.<sup>64</sup> encontraron que el salmón atlántico alimentado durante 3 semanas con una dieta basada en harina de pescado suplementada con 75 g/kg de inulina aumenta la masa relativa del tracto gastrointestinal, pero la capacidad de absorción del pez no se ve afectada. Una dieta con 20 g/kg de oligofructosa, un FOS producido por hidrólisis enzimática parcial de inulina, aumenta el crecimiento de larvas de rodaballo, pero 20 g/kg de inulina en sí misma no tiene efecto sobre el crecimiento<sup>65</sup>. El crecimiento, la eficiencia de la alimentación y la supervivencia se han mejorado en dos experimentos con trucha arco iris alimentada con una dieta que contiene 2 g/kg de MOS comparado con las truchas alimentadas con dieta basal<sup>62</sup>.

La concentración de proteína corporal en la trucha arco iris y la tilapia híbrida aumenta cuando el nivel de MOS aumenta en la dieta de 1,5 a 4,5 g/kg<sup>66</sup>. Por otra parte, una dieta suplementada con 10 g/kg de MOS o GOS, resulta en una disminución de la concentración de proteína en el cuerpo del salmón, lo cual está en línea con los resultados de Genc et al.<sup>67</sup> que alimentaron a *Penaeus semisulcatus* con una dieta que contenía 4,5 g/kg de MOS. Estos autores especularon que la concentración de proteínas en el cuerpo inferior en camarones alimentados con la dieta MOS puede haber sido el resultado de una menor utilización de aminoácidos y la digestibilidad de la dieta<sup>62</sup>. La suplementación dietética con inulina no afecta la composición corporal de la Beluga juvenil<sup>68</sup>. A pesar de estos resultados contradictorios, la ingesta de prebióticos depende del tipo de ingredientes utilizados en las formulaciones de la dieta y, por lo tanto, variará entre las especies y las dietas. El tipo de prebiótico para suplementar, características animales específicas (especie, edad, etapa de producción) y tipo de dieta se han identificado como consideraciones importantes al suplementar prebióticos en dietas de pescado. Sin embargo, muchos resultados experimentales no han sido concluyentes con respecto al beneficio de algunos de estos prebióticos. No obstante, debe prestarse atención al desarrollo de bioprocesos, formulaciones prácticas y consideraciones económicas que aseguren

la producción rentable y la disponibilidad de FOS y GOS para diferentes aplicaciones en el campo de los organismos acuáticos y la alimentación animal en general<sup>7</sup>.

### LOS LIPOPOLISACÁRIDOS COMO INMUNOESTIMULADORES

Los efectos del LPS sobre el sistema inmunológico del camarón han sido objeto de numerosos artículos. Los casos interesantes que pueden aportar evidencia de la posible aplicación de LPS como inmunoestimulante en la cría de camarón se describen a continuación. Los porcentajes de proliferación de hemocitos pueden aumentar, aproximadamente tres veces, después de la estimulación con LPS. Además, la captación de <sup>3</sup>H timidina en los hemocitos circulantes puede ser significativamente 26 veces mayor en camarones estimulados con LPS que en los no estimulados<sup>69</sup>.

El sistema de activación proPO del *Penaeus paulensis* mejora en gran medida con el tratamiento con LPS, lo que sugiere su participación en el no auto-reconocimiento<sup>70</sup>. Además, la actividad PO en el suero de camarón aumentó con el tratamiento con LPS. La administración oral de *Pantoea agglomerans* con LPS mejora la resistencia a la enfermedad frente a la viremia aguda de los peneidos e induce la actividad inactivadora de los virus en la hemolinfa del camarón Kuruma, *Penaeus japonicus*<sup>71</sup>. La proliferación de la mayoría de las células en el tejido hematopoyético del camarón tigre negro (*Penaeus monodon*) puede incrementarse significativamente después de la inyección de LPS<sup>72</sup>. La inyección de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* con LPS disminuyó los niveles de ARNm de péptidos antimicrobianos, penaeidin 2, penaeidin 3, penaeidin 4 de una manera dependiente de la dosis, mientras que los niveles de ARNm de serin proteínasa y proPO no cambian significativamente<sup>73</sup>. La estimulación de los hemocitos del camarón *Litopenaeus vannamei* con LPS conduce a la formación de trampas extracelulares características de fibras hechas a partir del ADN de la célula huésped<sup>74</sup>. Los grupos de camarón tigre negro (*Penaeus monodon*) alimentados con gránulos recubiertos con LPS mostraron mayores tasas de supervivencia que los grupos de control cuando se desafiaron frente a *Vibrio harveyi*<sup>75</sup>.

Además, los niveles de genes relacionados con la inmunidad como por ejemplo, la isoforma 3 del factor anti-LPS, la lectina de tipo C y la peritrofina de tipo mucina, están regulados en los intestinos del grupo de *P. monodon* alimentado con dieta suplementada con LPS una o dos veces al día, a diferencia de del grupo de control. La expresión de lectina 3 de tipo C de *Litopenaeus vannamei* en branquias está regulada positivamente después del desafío contra LPS<sup>76</sup>. Los LPSs pueden regular la cactina de *L. vannamei* en hemocitos<sup>77</sup>. La incubación de hemocitos de cama-

rón con LPS puede causar necrosis y liberar moléculas endógenas como por ejemplo, L,  $\beta$  y P, mientras que al mismo tiempo estas moléculas endógenas pueden causar cambios en la viabilidad celular, desgranulación y necrosis de hemocitos, indicativo de activación de la inmunidad *in vitro*<sup>78</sup>. La inyección de LPS causa una disminución de los recuentos totales de hemocitos semi-granulares y granulares de *Penaeus monodon*<sup>79</sup>. Además, la actividad de esterasa no específica, la producción de especies reactivas de oxígeno y la producción de óxido nítrico se induce significativamente en los hemocitos de camarón inyectado con LPS, mientras que la relación de células apoptóticas de hemocitos aumenta. Recientemente se han informado métodos para aislar y caracterizar los LPS con el fin de usarlos en el cultivo del camarón<sup>8</sup>.

## OBSERVACIONES FINALES

Ecuador y la India son actualmente los dos países que lideran la exportación de camarón (<http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resourcedetail/en/c/462149/>). Los tres principales destinos de exportación hasta 2016 de la industria del camarón ecuatoriano fueron Estados Unidos (35 000 toneladas), Unión Europea (44 000 toneladas) y Vietnam (80 000 toneladas). Por lo tanto, el diseño de bioprocesos para obtener un conjunto de moléculas para mejorar las técnicas biotecnológicas es necesario para hacer frente al aumento de la producción de camarón, contribuyendo así al éxito de esta industria.

La aplicación de probióticos, prebióticos<sup>80</sup> y LPS en acuicultura ha mostrado resultados positivos, pero la evaluación de los efectos biológicos de estas entidades en el medio natural y la rentabilidad de las opciones de tratamiento son insuficientes. Además, la mezcla de estos reactivos biológicos para formar simbióticos tiene un campo muy prometedor en cultivos de camarón<sup>81</sup> ya que esta estrategia ha tenido cierto éxito en otras especies marinas<sup>82</sup>.

Siguiendo las numerosas herramientas de secuenciación del genoma que están actualmente en uso, la investigación futura sobre probióticos, prebióticos y efectos de LPS debería involucrar el análisis de transcriptoma y proteoma usando ensayos de alto rendimiento. Además, se debe estudiar el desarrollo de transcriptomas y proteomas en la microbiota intestinal. Desde el punto de vista bacteriológico, es de gran importancia continuar evaluando si los cambios microbianos tienen algún efecto positivo sobre la salud de los peces y de las conchas, contribuyen a inhibir la colonización de las bacterias patógenas en el intestino y mejorar la inmunidad innata. Por lo tanto, los estudios con todas estas sustancias deberían tener una alta prioridad en el futuro, y los estudios de desafíos deberían incluirse como un estándar de oro para evaluar sus efectos sobre la salud del camarón.

## Referencias bibliográficas

1. Chavez H, Herrera Z. Análisis Estadístico de la Producción Camaronera del Ecuador. 2012. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/2139/1/4218.pdf>.
2. Wurmman G. C. REGIONAL REVIEW ON STATUS AND TRENDS IN AQUACULTURE DEVELOPMENT IN LATIN AMERICA AND THE CARIBBEAN – 2015; 2017. <http://www.fao.org/3/a-i6867e.pdf>.
3. Lescano E. Implementación de la nic 41 en un empresa camaronera. 2011. <http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/1409/1/T-UCSG-PRE-ECO-CICA-16.pdf>.
4. Ghosh AK, Bir J, Azad MAK, Hasanuzzaman AFM, Islam MS, Huq KA. Impact of commercial probiotics application on growth and production of giant fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879). *Aquac Reports*. 2016;4:112-117. doi:10.1016/j.aqrep.2016.08.001.
5. Romero J, Feijóo CG, Navarrete P. Antibiotics in aquaculture – Use, abuse and alternatives. In: *Health and Environment in Aquaculture*. ; 2012:160-198. doi:10.5772/28157.
6. Hernández Serrano P. Responsible use of antibiotics in aquaculture. *FAO Fish Tech Pap*. 2005;469(November 2011):97 pp. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
7. Trujillo LE, VE. Marcillo, R. Avalos, LK. Ponce TR. From the laboratory to the industry: Enzymatic production and applications of short chain fructooligosaccharides (FOS): Recent advances and current perspective. *Bionatura*. 2015;1(1):12-16. <http://revistabionatura.com/index.php/Bionatura/article/view/16>.
8. Hardy E, Rodriguez C, Trujillo LE. Lipopolysaccharide (LPS) and protein-LPS complexes: Detection and characterization by gel electrophoresis, mass spectrometry and bioassays. *Biol Med*. 2016;8(3). doi:10.4172/0974-8369.1000277.
9. Gismondo MR, Drago L, Lombardi A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *Int J Antimicrob Agents*. 1999;12(4):287-292. doi:10.1016/S0924-8579(99)00050-3.
10. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*. 1989;66(5):365-378. doi:10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x.
11. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concepts of Prebiotics. *J Nutr*. 1995;125(6):1401-1412. isi:A1995RC95800001.
12. Gibson GR, Probert HM, Loo J Van, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev*. 2004;17:259-275. doi:10.1079/NRR200479.
13. Gatesoupe F. Probiotics and prebiotics for fish culture, at the parting of the ways. *Aqua Feed Formul Beyond*. 2005;2(3):3-5. <http://www.feedware.com/index.html>.
14. Ravichandran S, Rameshkumar G, Prince AR. Biochemical Composition of Shell and Flesh of the Indian White Shrimp *Penaeus indicus* (H. milne Edwards 1837). *Am J Sci Res*. 2009;4(3):191-194.
15. Gatesoupe FJ. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia nauplii* as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture*. 2002;212(1-4):347-360. doi:10.1016/S0044-8486(02)00138-2.
16. Lazado CC, Caipang CMA. Atlantic cod in the dynamic probiotics research in aquaculture. *Aquaculture*. 2014;424-425:53-62. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.12.040.
17. Kumar A. Probiotics: An effective feed supplement in shrimp culture. *J Bangladesh Acad Sci*. 2014;38(2):127-130.
18. Moreira D, Sabrina M, Leivas FP, Romano LA, Ballester E. New Bacillus Probiotic Tested for Shrimp. *Glob Aquac Advocate*. 2011;Jan/Feb:46-47.
19. Moriarty DJW, Decamp OP, Lavens P. Probiotics in Aquaculture. *AQUA Cult Asia Pacific Mag*. 2005;1:14-16.
20. Utiswannakul P, Sangchai S, Rengpipat S. Enhanced growth of black tiger shrimp *Penaeus monodon* by dietary supplementation with *Bacillus* (BP11) as a probiotic. *J Aquat Res Dev*. 2011;3:2155-2164.
21. Scholz U, Garcia Diaz G, Ricque D, Cruz Suarez LE, Vargas Albores F, Latchford J. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture*. 1999;176(3-4):271-283. doi:10.1016/S0044-8486(99)00030-7.
22. Ajitha S, Sridhar M, Sridhar N, Singh ISB, Varghese V. Probiotic effects of lactic acid bacteria against *Vibrio alginolyticus* in *Penaeus* (*Fenneropenaeus*) *indicus*. *Asian J Fish Sci*. 2004;17:71-80.
23. Villamil L, Figueras A, Planas M, Novoa B. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture*. 2003;219(1-4):43-56. doi:10.1016/S0044-8486(02)00515-X.
24. Chythanya R, Karunasagar I, Karunasagar I. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture*. 2002;208(1-2):1-10. doi:10.1016/S0044-8486(01)00714-1.
25. Iyapparaj P, Maruthiah T, Ramasubburayan R, et al. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus* sp. MSU3IR against shrimp bacterial pathogens. *Aquat Biosyst*. 2013;9(1):12. doi:10.1186/2046-9063-9-12.
26. Lazado CC, Caipang CMA, Rajan B, Brinchmann MF, Kiron V. Characterization of GP21 and GP12: Two potential probiotic bacteria isolated from the gastrointestinal tract of Atlantic cod. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2010;2(2):126-134. doi:10.1007/s12602-010-9041-8.
27. Lazado CC, Caipang CMA, Brinchmann MF, Kiron V. In vitro adherence of two candidate probiotics from Atlantic cod and their interference with the adhesion of two pathogenic bacteria. *Vet Microbiol*. 2011;148(2-4):252-259. doi:10.1016/j.vetmic.2010.08.024.
28. Nogami K, Maeda M. Bacteria As Biocontrol Agents for Rearing Larvae of the Crab *Portunus Trituberculatus*. *Can J Fish Aquat Sci*. 1992;49(11):2373-2376. doi:10.1139/f92-261.

29. Rengpipat S., Rukpratanporn S, S. Piyatiratitivorakul and PM. Probiotics in Aquaculture: a case study of probiotics for larvae of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). In: Flegel TW, ed. *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok (TH); 1998:52-56.
30. Jha AK. Probiotics: An effective food supplement in shrimp culture. *J Bangladesh Acad Sci*. 2014;38:127-130. <http://www.banglajol.info/index.php/JBAS/article/viewFile/21336/14649>.
31. Lara-Flores M, Olvera-Novoa MA, Guzmán-Méndez BE, López-Madrid W. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 2003;216(1-4):193-201. doi:10.1016/S0044-8486(02)00277-6.
32. Irianto A, Austin B. Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Fish Dis*. 2003;26:59-62.
33. Lazado CC, Caipang CMA, Kiron V. Enzymes from the gut bacteria of Atlantic cod, *Gadus morhua* and their influence on intestinal enzyme activity. *Aquac Nutr*. 2012;18(4):423-431. doi:10.1111/j.1365-2095.2011.00928.x.
34. Johansson MW, Keyser P, Sritunyalucksana K, Söderhäll K. Crustacean hemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*. 2000;191:45-52.
35. Leonel Ochoa-Solano J, Olmos-Soto J. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiol*. 2006;23(6):519-525. doi:10.1016/j.fm.2005.10.004.
36. Chiu C-H, Guu Y-K, Liu C-H, Pan T-M, Cheng W. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish Shellfish Immunol*. 2007;23(2):364-377. doi:10.1016/j.fsi.2006.11.010.
37. Vieira FN, Buglione CC, Mouriño JPL, et al. Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec*. 2010;62(3):631-638. doi:10.1590/S0102-09352010000300019.
38. Brousseau JP, Talbot G, Beaudoin F, Lauzon K, Roy D, Lessard M. Effects of probiotics *Pediococcus acidilactici* strain MA18/5M and *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *boulardii* strain SB-CNCM I-1079 on fecal and intestinal microbiota of nursing and weanling piglets. *J Anim Sci*. 2015;93(11):5313-5326. doi:10.2527/jas.2015-9190.
39. Castex M, Lemaire P, Wabete N, Chim L. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. *Fish Shellfish Immunol*. 2010;28(4):622-631. doi:10.1016/j.fsi.2009.12.024.
40. Gullian M, Thompson F, Rodriguez J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 2004;233(1-4):1-14. doi:10.1016/j.aquaculture.2003.09.013.
41. Lakshmi B, Viswanath B, Sai Gopal DVR. Probiotics as antiviral agents in shrimp aquaculture. *J Pathog*. 2013;2013:424123. doi:10.1155/2013/424123.
42. Thompson J, Gregory S, Plummer S, Shields RJ, Rowley AF. An in vitro and in vivo assessment of the potential of *Vibrio* spp. as probiotics for the Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J Appl Microbiol*. 2010;109(4):1177-1187. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04743.x.
43. Bricknell I, Dalmo RA. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol*. 2005;19(5 SPEC. ISS.):457-472. doi:10.1016/j.fsi.2005.03.008.
44. Meena DK, Das P, Kumar S, et al. Beta-glucan: An ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiol Biochem*. 2013;39(3):431-457. doi:10.1007/s10695-012-9710-5.
45. Raa J. Immune modulation by non-digestible and non-absorbable beta-1,3/1,6-glucan. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:1-4.
46. Dawood MAO, Koshio S, Ishikawa M, et al. Dietary supplementation of  $\beta$ -glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquac Nutr*. 2016. doi:10.1111/anu.12376.
47. Kumar V, Roy S, Meena DK, Sarkar UK. Application of Probiotics in Shrimp Aquaculture: Importance, Mechanisms of Action, and Methods of Administration. *Rev Fish Sci Aquaculture*. 2016;24:342-368.
48. Pais-Chanfrau JM, Trujillo-Toledo LE. Optimization of culture medium for large-scale production of heterologous proteins in *Pichia pastoris* to be used in nanoscience and other biotechnological fields. *Biol Med*. 2016;8(3). doi:10.4172/0974-8369.1000279.
49. Mahious AS, Gatesoupe FJ, Hervi M, Metailler R, Ollevier F. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). *Aquac Int*. 2006;14(3):219-229. doi:10.1007/s10499-005-9003-4.
50. Fooks LJ, Fuller R, Gibson GR. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int Dairy J*. 1999;9(1):53-61. doi:10.1016/S0958-6946(99)00044-8.
51. Sang HM., Ky LT, Fotedar R. Dietary supplementation of mannan oligosaccharide improves the immune responses and survival of marron, *Cherax tenuimanus* when challenged with different stressors. *Fish Shellfish Immunol*. 2009;27:341-348.
52. Sang HM, Fotedar R. Effects of dietary  $\beta$ -1,3-glucan on the growth, survival, physiological and immune response of marron, *Cherax tenuimanus*. *Fish Shellfish Immunol*. 2010;28:957-960.
53. Bailey JS, Blankenship LC, Cox NA. Effect of fructooligosaccharide on *Salmonella* colonization of the chicken intestine. *Poult Sci*. 1991;70(12):2433-2438. doi:10.3382/ps.0702433.
54. Carbone D, Faggio C. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol*. 2016;54:172-178. doi:10.1016/j.fsi.2016.04.011.
55. Song SK, Beck BR, Kim D, et al. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. *Fish Shellfish Immunol*. 2014;40(1):40-48. doi:10.1016/j.fsi.2014.06.016.
56. Mussatto SI, Mancilha IM. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydr Polym*. 2007;68(3):587-597. doi:10.1016/j.carbpol.2006.12.011.
57. Li P, Burr GS, Gatlin DM, et al. Dietary supplementation of short-chain fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in a recirculating system. *J Nutr*. 2007;137(12):2763-2768. doi:10.1093/jn/137.12.2763 [pii].
58. Gatlin III DM, Li P, Wang X, Burr GS, Castille F, Lawrence AL. Potential application of prebiotics in aquaculture. VIII Simp Int Nutr Acuicola. 2006:371-376.
59. Gibson GR. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J Nutr*. 1999;129(7 Suppl):1438S-41S.
60. Gibson GR. Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose Dietary Modulation of the Human Gut Microflora Using the Prebiotics Oligofructose and Inulin I. *Pathology*. 1999;129(7 Suppl):1438-1441. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395616>.
61. Trujillo L, Granda S, Ordoñez M, Ramos T, Avalos R. Detection of short chain inulin (FOS)-fermenting microorganisms useful in food and health science. *African J Biotechnol*. 2015;14(38):2759-2764. doi:10.5897/AJB2015.14852 I.
62. Gridale-Helland B, Helland SJ, Gatlin DM. The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. 2008;283(1-4):163-167. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.07.012.
63. Li P, Gatlin DM. Dietary brewers yeast and prebiotic Grobiotic® AE influence growth performance immune responses and resistance of hybrid striped sea bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to streptococcus iniae infection. *Aquaculture*. 2004;231:445-456.
64. Refstie S, Bakke-McKellep AM, Penn MH, Sundby A, Shearer KD, Krogdahl Å. Capacity for digestive hydrolysis and amino acid absorption in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with soybean meal or inulin with or without addition of antibiotics. *Aquaculture*. 2006;261(1):392-406. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.08.005.
65. Mahious AS, Ollevier F. Probiotics and Prebiotics in Aquaculture. In: 1st Regional Workshop on Techniques for Enrichment of Live Food for Use in Larviculture-2005, AAARC, Urmia, Iran. ; 2005:67.
66. Yilmaz, E., Genc MA, Genc E. Effects of dietary mannanoligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Isr J Aquac*. 2007;59:182-188.



67. Genc MA, Aktas M, Genc E, Yilmaz E. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth, body composition and hepatopancreas histology of *Penaeus semisulcatus* (de Haan 1844). *Aquac Nutr*. 2007;13(2):156-161. doi:10.1111/j.1365-2095.2007.00469.x.
68. Akrami A, Hajimoradloo A, Matinfar A, Abedian Kinai A. Effect of dietary prebiotic Inulin on growth performance, intestinal microflora, body composition and hematological performance of juvenile Beluga Huso huso (Linnaeus, 1758). *J World Aquac Soc*. 2010;40:771-779.
69. Sequeira T, Tavares D, Arala-Chaves M. Evidence for circulating hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus*. *Dev Comp Immunol*. 1996;20(2):97-104. doi:10.1016/0145-305X(96)00001-8.
70. Perazzolo LM, Barracco MA. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. *Dev Comp Immunol*. 1997;21(5):385-395. doi:10.1016/S0145-305X(97)00022-0.
71. Fukasaka M, Asari D, Kiyotoh E, et al. A lipopolysaccharide from *Pantoea agglomerans* is a promising adjuvant for sublingual vaccines to induce systemic and mucosal immune responses in Mice via TLR4 pathway. *PLoS One*. 2015;10(5). doi:10.1371/journal.pone.0126849.
72. van de Braak CBT, Botterblom MH a, Liu W, Taverne N, van der Knaap WPW, Rombout JHWM. The role of the haematopoietic tissue in hemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Shellfish Immunol*. 2002;12(3):253-272. doi:10.1006/fsim.2001.0369.
73. Okumura T. Effects of lipopolysaccharide on gene expression of antimicrobial peptides (penaeidins and crustin), serine proteinase and prophenoloxidase in haemocytes of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*. 2007;22(1):68-76. doi:10.1016/j.fsi.2006.03.013.
74. Ng TH, Chang SH, Wu MH, Wang HC. Shrimp hemocytes release extracellular traps that kill bacteria. *Dev Comp Immunol*. 2013;41(4):644-651. doi:10.1016/j.dci.2013.06.014.
75. Rungrassamee W, Maibunkaew S, Karoonuthaisiri N, Jiravanichpaisal P. Application of bacterial lipopolysaccharide to improve survival of the black tiger shrimp after *Vibrio harveyi* exposure. *Dev Comp Immunol*. 2013;41(2):257-262. doi:10.1016/j.dci.2013.05.021.
76. Zhang XW, Wang Y, Wang XW, Wang L, Mu Y, Wang JX. A C-type lectin with an immunoglobulin-like domain promotes phagocytosis of hemocytes in crayfish *Procambarus clarkii*. *Sci Rep*. 2016;6:29924.
77. Zhang S, Shi L, Yang Q-H, et al. Molecular characterization and functional analysis of Cactin gene from *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*. 2014;41(2):608-617. doi:10.1016/j.fsi.2014.10.014.
78. Chen YY, Chen JC, Lin YC, et al. Endogenous molecules induced by a Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP) elicit innate immunity in shrimp. *PLoS One*. 2014;9(12). doi:10.1371/journal.pone.0115232.
79. Xian JA, Zhang XX, Guo H, Wang DM, Wang AL. Cellular responses of the tiger shrimp *Penaeus monodon* haemocytes after lipopolysaccharide injection. *Fish Shellfish Immunol*. 2016;54:385-390.
80. Akhter N, Wu B, Memon AM, Mohsin M. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish Shellfish Immunol*. 2015;45(2):733-741. doi:10.1016/j.fsi.2015.05.038.
81. Huynha T-G, Shiu Y-L, Nguyenb, Thanh-Phuong Truongb Q-P, Chenc J-C, Chun-Hung L. Current applications, selection, and possible mechanisms of actions of synbiotics in improving the growth and health status in aquaculture: A review. *Fish Shellfish Immunol*. 2017;In Press.
82. Widanarni, Tanbiyaskur. Application of probiotic, prebiotic and synbiotic for the control of streptococcosis in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pakistan J Biol Sci*. 2015;18(2):59-66. doi:10.3923/pjbs.2015.59.66.
83. Lazado CC, Lacsamana JL, Caipang CMA. Mechanisms of probiotic actions in shrimp: Implications to tropical aquaculture. In: Caipang CMA, Bacano-Maningas MBI, Fagutao FF, eds. *Biotechnological Advances in Shrimp Health Management in the Philippines*. Kerala, India: Research Signpost; 2015.

Recibido: Febrero de 2017.

Aprobado: Mayo de 2017.

ORCID

Connecting Research  
and Researchers

PARA  
INVESTIGADORES

PARA  
ORGANIZACIONES

QUIÉNES  
SOMOS

AYUDA

<https://orcid.org/>

DISTÍNGASE EN  
TRES SENCILLOS PASOS

ORCID proporciona un identificador digital persistente que lo distingue a usted de todos los otros investigadores y, por medio de la integración en flujos de trabajo de investigación clave, como presentación de manuscritos y subvenciones, acepta enlaces automatizados entre usted y sus actividades profesionales, garantizando que su trabajo sea reconocido.



REGÍSTRESE

Obtenga su Identificador único ORCID ¡Regístrese ahora!  
Registrarse lleva 30 segundos.

## ARTÍCULO DE REVISIÓN

## Consideraciones en el tratamiento anestésico en pacientes sometidos a tiroidectomía transoral.

### Anesthetic Considerations for treatment in patients undergoing thyroidectomy transoral.

Secundino González Pardo<sup>1</sup>, Silvana Paspuel Yar<sup>2</sup>, Adonis Frómata Guerra<sup>3</sup>, Sandra Amalia Sánchez Figueredo<sup>4</sup>

DOI. 10.21931/RB/2017.02.02.9

## RESUMEN

La anestesia para la tiroidectomía transoral en adultos inicia con la evaluación preoperatoria del estado de la glándula tiroidea, la repercusión local de la patología tiroidea sobre la vía aérea y los riesgos relacionados con las características del paciente. La cirugía de la glándula tiroidea no se considera una urgencia quirúrgica, por lo que es necesario lograr un estado eutiroideo antes de la cirugía. Para evitar la crisis tirotóxica por un lado se bloquea la síntesis hormonal con anti-tiroideos de síntesis y por otro se disminuyen los efectos centrales y periféricos de las hormonas tiroideas con betabloqueadores. La técnica de elección es la anestesia general balanceada o total intravenosa. La atención postoperatoria se debe esforzar en investigar la posible presencia de las complicaciones hemorrágicas que pueden poner en riesgo el pronóstico vital y las lesiones de los elementos en contacto con la glándula, como las glándulas paratiroides y los nervios recurrentes. Los cuidados anestésicos del paciente sometido a tiroidectomía transoral no difieren de las otras técnicas quirúrgicas mínimamente invasiva del tiroides.

**Palabras Claves:** anestesia, anestesia general balanceada, anestesia total intravenosa, tiroidectomía transoral.

## ABSTRACT

Anesthesia for transoral thyroidectomy in adults begins with preoperative evaluation of the thyroid gland status, local repercussion of thyroid pathology on the airway, and risks related to patient characteristics. Surgery of the thyroid gland is not considered a surgical emergency, so it is necessary to achieve a euthyroid state before surgery. To avoid the thyrotoxic crisis, on the one hand, hormonal synthesis is blocked with synthetic antithyroid drugs and on the other, the central and peripheral effects of thyroid hormones with beta-blockers are reduced. The technique of choice is balanced general or intravenous total anesthesia. Postoperative care should be sought to investigate the possible presence of hemorrhagic complications that may compromise the vital prognosis and lesions of the elements in contact with the gland, such as the parathyroid glands and recurrent nerves. Anesthesia care of the patient undergoing transoral thyroidectomy does not differ from the other minimally invasive thyroid surgical techniques.

**Key Words:** anesthesia, balanced general anesthesia, total intravenous anesthesia, transoral thyroidectomy.

### Introducción

Con el desarrollo de la medicina mínimamente invasiva se han diseñado múltiples abordajes endoscópicos en diferentes sitios del cuerpo. El área de cabeza y cuello no ha quedado excluida de esta tendencia mundial y en 1996 Gagner describió una paratiroidectomía subtotal endoscópica con insuflación de dióxido de carbono usando 4 trocares cervicales. Seguidamente, Huscher et al. publicaron una técnica similar para la tiroidectomía endoscópica<sup>1</sup>.

Cada vez son más novedosas las técnicas quirúrgicas para abordar el territorio de cabeza y cuello hasta llegar al primer sistema de cirugía robótica de uso clínico generalizado, el *da Vinci*, comercializado a finales de 1999<sup>2</sup>. Sin embargo, son pocos los estudios publicados sobre el manejo anestésico de los pacientes sometidos a este tipo cirugía, donde se necesita una gran fusión entre el cirujano y anestesista basado en el

espacio reducido para ambos poder realizar su trabajo.

El manejo anestésico-quirúrgico para procedimientos otorrinolaringológicos y de cirugía de cabeza y cuello, requiere del conocimiento anatómico, fisiológico y fisiopatológico de los estados mórbidos, en pacientes con distintos rangos de edad, desde la infancia hasta la senectud en diversos escenarios clínicos, que ponen a prueba la creatividad y habilidades de los médicos en este campo, ya que los procedimientos diagnósticos o terapéuticos se desarrollan en regiones muy innervadas como ojos, nariz, boca, faringe, laringe, tráquea y pulmones; que aunado a la rica vascularidad de la cabeza y cuello, con la probabilidad alta de sangrado, repercuten la perfusión del cerebro<sup>3</sup>.

Esta revisión muestra las principales formas de tratamiento anestésico en pacientes sometidos a cirugía mínimamente invasiva de cuello haciendo énfasis en la tiroidectomía transoral.

<sup>1</sup> Médico tratante en Anestesiología y Reanimación del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social. Profesor de la universidad técnica del norte. Facultad de Ciencia de la Salud.

<sup>2</sup> Lic. en Hospital San Vicente de Paul. Ibarra Ecuador, Profesor de la universidad técnica del norte. Facultad de Ciencia de la Salud.

<sup>3</sup> Médico tratante de Medicina Interna del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social. Profesor asistente

<sup>4</sup> Médico tratante de Medicina Intensiva del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social. Profesor asistente

## DESARROLLO

Los cuidados anestésicos de la cirugía de tiroides no comienzan en el salón de operaciones, sino desde la elección del paciente, lo dividiremos en tres etapas fundamentales:

### Preoperatorio. Preparación para la cirugía de la glándula tiroides.

El manejo anestésico de la tiroidectomía está condicionado por la patología tiroidea y por las posibles complicaciones derivadas de la situación anatómica de la glándula. El tratamiento previo a la cirugía se efectúa según distintos esquemas, dependientes del equipo médico-quirúrgico, del paciente y los recursos disponibles. Sólo en el bocio con hipertiroidismo es necesario el tratamiento preoperatorio para conseguir el estado *eutiroides* y evitar la crisis tirotóxica postoperatoria. La finalidad de la preparación es doble, por un lado, se bloquea la síntesis hormonal con antitiroideos de síntesis y por otro se disminuyen los efectos centrales y periféricos de las hormonas tiroideas con betabloqueadores, que además de suprimir algunos signos de tirotoxicosis (hiperexcitabilidad muscular, alteraciones cardiovasculares y de la termorregulación), inhiben la conversión de T4 en T3, reducen la taquicardia, las palpitaciones y el temblor. Si los betabloqueantes están contraindicados, pueden utilizarse alternativas como los antagonistas del calcio, que ejercen acciones similares al propranolol pero por distintos mecanismos. El tratamiento debe iniciarse 7- 14 días antes de la cirugía para lograr el eutiroidismo<sup>4,5</sup>. Además de los niveles hormonales de tiroides, se dan gran énfasis a la evaluación de cualquier manejo de vía aérea difícil<sup>6</sup>.

El estudio preanestésico previo a una tiroidectomía responde a los criterios habituales de evaluación del riesgo anestésico, como la decisión de una premedicación ansiolítica, de información al paciente y de preparación para la intervención quirúrgica. En el plano biológico, la cervicotomía es una cirugía programada con un riesgo hemorrágico limitado y que sólo necesita un estudio de hemostasia cuando existen signos de una coagulopatía clínica<sup>5</sup>. En la consulta se deberán evaluar también las anomalías de la función tiroidea y la repercusión sobre la vía aérea de la enfermedad tiroidea<sup>5</sup>.

### Valoración de la vía aérea

La valoración de la vía aérea se sustenta en la búsqueda de los criterios de intubación difícil: clasificación de Mallampati (Figura 1), movilidad de la columna cervical, implantación de los dientes, distancia tiromentoniana, morfología mandibular, aber-

tura bucal e índice de masa corporal<sup>5,7,8</sup>. También se debe evaluar la extensión y la repercusión local del bocio. La disnea, la disfagia y la disfonía son signos clásicos de compresión. No obstante, la presencia de un bocio, incluso voluminoso, no parece aumentar la incidencia de las intubaciones difíciles<sup>5,8</sup>.

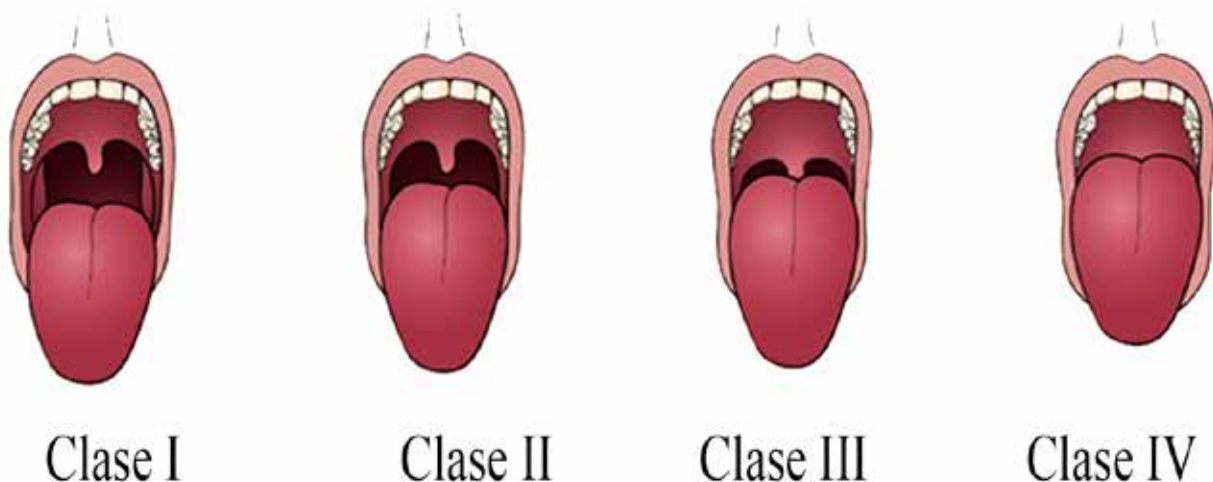
La mayoría de los autores, entre ellos Garot<sup>5</sup> y colaboradores, plantean que las dificultades para la intubación (figura 2) aumentan cuando el bocio es de origen neoplásico. Cuando se asocia a disnea y a una desviación o una compresión de la tráquea, el estrechamiento de la luz traqueal suele ser superior al 30%, lo que en presencia de una limitación de la abertura bucal (< 4,4 cm) hace que la intubación endotraqueal sea más peligrosa.

Una disminución aislada de más del 30% de la luz traqueal no suele dificultar el proceder. Un profundo conocimiento de la anatomía quirúrgica y la vía del nervio es necesario para proteger de lesiones el paso del tubo endotraqueal. No obstante, el orificio glótico puede estar ascendido o con una desviación lateral<sup>9</sup>.

El análisis morfológico de un bocio descendido intratorácico y de su repercusión sobre los elementos mediastínicos como la tráquea y los vasos se realiza idealmente mediante una tomografía computarizada (TC) cervicotorácica y/o resonancia magnética (RM)<sup>5,10,11</sup>. La laringoscopia preoperatoria permite evaluar la integridad de las cuerdas vocales. Numerosos equipos recomiendan este examen<sup>12</sup>. En una serie de 761 pacientes con lesión laríngea tras tiroidectomía, el 20% presentaba una anomalía en la movilidad de las cuerdas vocales en el preoperatorio<sup>13</sup>. Otros equipos realizan la laringoscopia en caso de disfonía con el riesgo de pasar por alto una lesión laríngea oculta<sup>14</sup> y/o de reintervención quirúrgica.

La constatación preoperatoria de la movilidad de las cuerdas vocales, bien por fibrolaringoscopia, bien por laringoscopia indirecta, puede ayudar a decidir la estrategia quirúrgica<sup>5</sup>. Aunque todos los autores reconocen su utilidad, suelen admitir que no la realizan rutinariamente.

En nuestro criterio solo en las situaciones que mencionaremos a continuación es necesario realizar la laringoscopia: a. En pacientes con antecedentes de cirugía tiroidea o cervical, b. Si el paciente presenta disfonía o cambios en el tono de voz, c. Que vaya a realizarse neuromonitorización intraoperatoria, d. En casos de afección maligna, en casos de cánceres avanzados o anaplásicos se debe complementar con broncoscopia y esofagoscopia, e. En enfermedad benigna, cuando se prevea un mayor riesgo recurrencial, como en grandes bocios endotorácicos con compresión o desplazamiento traqueal.



**Figura 1:** Test de Mallampati: Técnica: paciente en posición sentada, con la cabeza en extensión completa, efectuando fonación y con la lengua fuera de la boca. Indica el tamaño de la lengua y en que magnitud ésta oscurece la visión de la buco-faringe. Clase I: visibilidad del paladar blando, úvula y pilares amigdalinos. Clase II: visibilidad de paladar blando y úvula. Clase III: visibilidad del paladar blando y base de la úvula. Clase IV: imposibilidad para ver paladar blando. Las clases III y IV corresponden a laringoscopia e intubación difícil.



**Figura 2:** Proceder de intubación en paciente sometidos a cirugía de tiroides. Anaesthesiologist performing urgent endotracheal intubation. Copyright Andrei Malov | Dreamstime.com.

### Transoperatorio. Premedicación anestésica

La comunicación entre cirujano y anestesiólogo es crucial, y puede repercutir en los resultados. No existe consenso sobre los fármacos a usar en la premedicación anestésica en la tiroidectomía transoral, como medicación pre anestésica se puede iniciar el día anterior, con benzodiazepinas. En bocios grandes y con posible obstrucción de la vía aérea se evita la sedación excesiva.

Aunque se han descrito varias vías de administración de las benzodiazepinas, la mayoría de los autores recomiendan la premedicación oral. Esta última es eficaz y se tolera bien con independencia de la edad del paciente, a pesar de un lapso hasta la aparición del efecto clínico máximo de al menos 30 minutos. La vía oral no genera ansiedad, al contrario de la vía intramuscular. Se ha observado un efecto preventivo de las benzodiazepinas sobre las náuseas y vómitos postoperatorios, inicialmente en cirugía tiroidea<sup>15</sup>.

Garot y colaboradores<sup>5</sup>, proponen que podrían beneficiarse ventajosamente la premedicación de los efectos ansiolíticos de la gabapentina, administrada a dosis de 900-1.200 mg, 2 horas antes de la intervención quirúrgica. A estas dosis, esta administración preoperatoria reduce el consumo peroperatorio de opiáceos y parece prevenir la aparición de dolores retardados a los 6 meses.

De forma general se recomienda evitar el uso de anticolinérgicos, por el aumento de la frecuencia cardíaca y la disminución en la sudoración; si el paciente lo precisa, podría utilizarse glicopirrolato que tiene menos efecto cronotrópico<sup>3,5</sup>.

No se recomienda la profilaxis antibiótica para una tiroidectomía transoral. En el caso de que se decida administrar profilaxis

antibiótica, el agente de elección en este caso sería la cefazolina<sup>5</sup>. La cirugía de tiroides transoral es electiva al menos en nuestro medio. Suele emplearse una anestesia general con intubación traqueal y relajación muscular, aunque muchos cirujanos utilizan rutinariamente un TET con un dispositivo de control de la integridad de los nervios (CIN) para realizar un control neurofisiológico<sup>16</sup>. En este caso, debe evitarse administrar bloqueantes neuromusculares durante el período posterior a la intubación<sup>5,16</sup>.

### Colocación del paciente

Tras la intubación y la comprobación de la correcta posición del tubo endotraqueal, éste se fija sólidamente. Las dificultades de accesibilidad a la cabeza del paciente hacen necesaria una minuciosa protección ocular que se garantiza con una pomada oftálmica o un colirio y mediante la oclusión de los párpados, cuya apertura se ve favorecida por la posición de la mesa quirúrgica. Un fallo de la protección ocular puede tener consecuencias graves, especialmente en los pacientes con enfermedad de Graves-Basedow que presentan exoftalmos. La colocación sobre la mesa quirúrgica debe permitir la mejor exposición de la región cervical y desbloquear la entrada del tórax en caso de bocio endotorácico. La cabeza se coloca sin hiperextensión, con una posición estrictamente sagital, manteniéndola en ocasiones con un rodillo de cabeza y cinta adhesiva. En los pacientes con un cuello especialmente corto, la exposición satisfactoria de la región quirúrgica puede necesitar la elevación temporal de la cintura escapular colocando un rodillo a nivel de la punta de los omoplatos. En los pacientes con artrosis, hay que comprobar que la cabeza no

se despegan del plano de la mesa; se han descrito casos excepcionales de compresión medular. Los brazos se mantienen a lo largo del cuerpo, mientras que la mesa se coloca en posición inclinada unos 25° para favorecer el drenaje venoso cervical. Debido a la falta de acceso a la cabeza, se debe colocar un prolongador para poder realizar las inyecciones fuera del campo quirúrgico. Se coloca una sonda nasogástrica en caso de bocio endotorácico y en algunas ocasiones si se va a realizar un vaciamiento ganglionar, de esta forma se le permite al cirujano una identificación más fácil del esófago<sup>5,16,17</sup>.

La tiroidectomía transoral requiere de un espacio o cavidad para el abordaje con insuflación. El límite máximo de la presión de CO<sub>2</sub> debe estar en 10 mm, ya que el objetivo es realizar una pequeña cavidad donde pueda practicarse una disección mínima con los instrumentos que permita la identificación, pinzamiento y extracción. Entre las complicaciones referidas con la utilización de gas tenemos: hipercapnia, acidosis respiratoria y enfisema subcutáneo<sup>18</sup>.

### Anestesia general

Hoy van a cirugía pacientes con patologías complejas que requieren de equipos quirúrgicos especializados (microscopios, equipos endoscópicos, rayo láser, etc.); cerca de 90% de pacientes necesitan control estricto de la vía aérea (intubación traqueal), por lo tanto, requieren de anestesia general: Anestesia General Balanceada (AGB) o Total Intravenosa Anestesia (TIVA).

En el caso de la cirugía de tiroides transoral se recomienda el uso de cualquiera de las dos variantes con intubación nasotraqueal para el confort del cirujano.

Anestesiología y cirugía evolucionan, para ajustarse a las necesidades individuales del paciente, con base en la investigación de nuevos fármacos anestésicos, con perfiles farmacológicos que ofrecen mayor predictibilidad y seguridad; desarrollando dispositivos más precisos para su administración (vaporizadores y bombas perfusoras TCI guiadas a modo plasma o sitio efecto, basadas en modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos); invención de dispositivos específicos para el manejo de la vía aérea; favoreciendo positivamente los resultados. Los agentes anestésicos para la inducción y mantenimiento se eligen de forma individualizada<sup>5</sup>.

Con base en lo anterior exponemos, las recomendaciones generales para las dosis de carga y perfusiones de los opioides empleados comúnmente en la anestesia general para cirugía de tiroides transoral que no difiere en gran medida de las otras vías de abordaje mínimamente invasiva: quedando a cargo del anestesiólogo considerar la variabilidad interindividual; sus covariables, los dispositivos de administración, el estímulo nociceptivo y los retos de cada tipo de cirugía, incluso la pericia, habilidad y experiencia del cirujano en turno<sup>3</sup>.

La inducción de la anestesia general se recomienda por vía IV que brinda mayor biodisponibilidad de fármacos. Se recomienda utilizar ansiolíticos y parasimpaticolíticos, previo a opioides, para reducir la ansiedad, brindar protección neurovegetativa y efecto antisialogogo. Hipnosis (propofol, tiopental, etomidato o midazolam) y BNM (rocuronio, cisatracurio o succinilcolina) para facilitar la ventilación por mascarilla y la instrumentación de la vía aérea. El mantenimiento: de AGB con oxígeno, halogenados (isoflurano, sevoflurano o desflurano) y opioides (bolos múltiples o perfusión) o TIVA: manual (MCI) o infusión controlada por objetivo (TCI), son opciones adecuadas<sup>16</sup>.

Los pacientes quirúrgicos en este tipo de cirugía reciben también infiltración de anestésicos locales con vasopresores (adrenalina) para disminuir sangrado; sin embargo, en combinación con halogenados, aumenta la sensibilidad del miocardio a las catecolaminas exógenas y puede desencadenar arritmias peligrosas para la vida. La cantidad de adrenalina capaz de producir arritmias es: 2.1 µg/kg halotano, 6.7 µg/kg isoflurano, desflurano y sevoflurano, y 10.9 µg/kg enflurano<sup>3,16</sup>.

Los opioides proporcionan excelente analgesia transoperatoria y postoperatoria (excepto remifentanyl). En TIVA se recomienda propofol que posee efectos antieméticos, se debe titular la perfusión manual a tasas entre 90-180 µg/kg/min (Cp aprox. 3-6 µg/mL) o TCI con modelos para pacientes adultos jóvenes y viejos, a modo plasma o sitio efector con dianas entre 3-6 µg/mL<sup>3</sup>.

En la Tabla 1 representamos los opioides más usados en la práctica médica con sus diferentes características farmacocinéticas y farmacodinámicas.

La inducción con fentanilo se recomienda en bolo manual en pacientes ASA I y II de 3-5 µg/kg de peso real; pacientes hemo-

	Fentanilo	Sufentanilo	Alfentanilo	Remifentanilo
pKa	8,4	8	6,5	7,1
% no ionizado a pH 7.4	<? ?	20	90	¿67?
Coefficiente de partición octanol – H <sub>2</sub> O	813	1,778	145	17,9
% unidos a proteínas plasmáticas	84	93	92	¿80?
Fración que difunde (%)	1,5	1,6	8	¿13,3?
t <sup>1/2</sup> ? (min)	1-2	1-2	1-3	0,5 - 1,5
t <sup>1/2</sup> ? (min)	10-30	15-20	4-17	5-8
t <sup>1/2</sup> ? (h)	2-4	2-3	1-2	0,7-1,2
Vd <sub>c</sub> (l/Kg)	0,4-1	0,2	0,1-0,3	0,06-0,08
Vd <sub>ss</sub> (l/Kg)	3-5	2,5-3	0,4-1	0,2-0,3
Aclaramiento (ml/min/Kg)	10-20	10-15	4-9	30-40
Razón de extracción hepática	0,8-1	0,7-0,9	0,3-0,5	NA

Adaptado de Bailey PL, Egan TD, Stanley TH: Intravenous opioid anesthetics. In Miller RD, editor: Anesthesia, ed 7. Philadelphia, 2010, Churchill Livingstone, p 791. NA, no aplicable; pKa, constante de disociación iónica; t<sup>1/2</sup>a, t<sup>1/2</sup>b, t<sup>1/2</sup>g, semividas en el modelo tri-compartmental; Vdc, volumen de distribución en el compartimento central; Vdee, volumen de distribución en el estado estacionario.

**Tabla 1:** Datos Físico – Químicos y farmacocinéticos de los agonistas opioideos que se emplean habitualmente

dinámicamente estables ASA III, titular 3-4 µg/kg. Es recomendable dar el bolo lento (más de 90 segundos); a mayor velocidad, más efectos secundarios (tórax leñoso y depresión respiratoria) principalmente pacientes en los extremos de la vida. Mantenimiento: fentanyl manual en tasas de perfusión 0.013-0.072 µg/kg/min (Cp aprox. 0.001-0.006 µg/mL) de acuerdo con el estímulo nociceptivo de cada cirugía, aconsejando disminuir las tasas de perfusión en 30-60 minutos, de 0.052-0.026 µg/kg/min (Cp aprox. 0.004-0.002 µg/mL), es decir, cerca del piso de la ventana terapéutica para permitir la ventilación espontánea del paciente y la emersión anestésica entre 10-15 minutos después del cierre de la perfusión<sup>3,17</sup>.

Si la perfusión se prolongara más de 120 minutos, la acumulación es inevitable (50 minutos VMSC) y 180 minutos (100 minutos VMSC), prolongando el despertar. En TCI plasma o sitio efector (dependiendo el modelo FC/FD elegido Scott, Shafer): se sugiere «dianas» de 3-5 ng/mL en pacientes hemodinámicamente estables; el TCI calcula la dosis de carga y la perfusión sobre el tiempo para alcanzar y mantener las Cp y Ce predichas por el modelo utilizado, así como la eliminación y acumulación del fármaco para evitar la sobredosificación (porcentaje decremental de la Cp 20, 50 y 80%) y de esta forma favorecer la emersión anestésica adecuada sin depresión ventilatoria (Cp aprox. 2 ng/mL) y con analgesia residual, principalmente cuando se acompaña de monitoreo cerebral para los componentes del estado anestésico<sup>3,16</sup>.

En la inducción el sufentanilo se recomienda con bolo de 0.3-0.5 µg/kg equivalentes (Cp aprox. 200-400 pcg/mL), sufentanilo 0.3 ng/mL combinado con propofol 3.5 µg/mL fueron suficientes para bloquear la respuesta a la intubación en 50% de los pacientes, Cp aprox. 300 pcg/mL (bolo inicial a 12 µg IV) la cual puede ser recomendada para intubación en pacientes paralizados, pero puede ser insuficiente cuando no se utiliza bloqueador muscular e hipnóticos<sup>3</sup>.

En la fase de mantenimiento la perfusión es manual con una tasa entre 0.0002-0.0006 µg/kg/min o 0.15-0.22 mg/kg/h con una Cp aprox. 0.200-600 pcg, respectivamente. Se debe disminuir la Cp hasta 0.25 ng/mL para iniciar con ventilación espontánea; cerrar la infusión entre 15 a 20 minutos antes del fin de la cirugía para obtener un despertar con adecuada analgesia postoperatoria. TCI plasma o sitio efector (modelo de Geps) con dianas de 0.2-0.6 ng/mL mostrando una adecuada estabilidad transanestésica con un suave y confortable despertar en corto tiempo (ventilación espontánea rango entre 0.13-0.03 ng/mL).

Utilizando la Anestesia Intravenosa Total (TIVA) o infusión controlada por objetivo (TCI) el efecto del propofol Ce 3 µg/mL y sufentanyl Ce 0.4 ng/mL proveen una anestesia profunda con recuperación de la conciencia más rápida que con fentanyl o alfentanyl, debido a que es un fármaco que se acumula menos y tiene un mejor perfil para perfusión<sup>3,16</sup>.

EL remifentanilo es un opioide agonista µ, que únicamente puede ser administrado vía IV (glicina, neurotóxica). Su cinética al bolo y perfusión es independiente de la dosis total, y de la duración de la infusión (acumulación mínima en pacientes con severa disfunción hepática o renal). Al suspender la infusión, su efecto se termina en forma rápida (4-8 minutos) requiriendo de analgesia multimodal, desde este momento y complementar con AINES intravenosos, y opioides débiles, para brindar analgesia de transición durante el postoperatorio: tramadol de 1-2 mg/kg o morfina 100-200 µg/kg, en casos especiales buprenorfina de 2-5 mg/kg por dosis y ketamina 0.2 mg/kg IV para evitar la hiperalgesia inducida por opioides potentes al suspender la perfusión. Inducción: bolo (no recomendado): 1 µg/kg IV alta posibilidad de causar tórax leñoso. Mantenimiento: A) remifentanyl perfusión manual: iniciar perfusión a (Cp aprox. 0.003-0.006 µg/mL), es decir, tasas de 0.12 a 0.24 µg/kg/min incrementando la perfusión de forma gradual (escalonada en los primeros 3 a 5 minutos). B) Remifentanyl TCI (modelo de Minto) a modo plasma o sitio efector, con dispositivos como el Rugloop o la Orchestra Base Primea.

Obtener dianas de 3-5 ng/mL, con propofol u halogenados; incluso hasta 10 ng/mL cuando se realiza TIVA con midazolam<sup>3,16</sup>.

En el salón de cirugía del hospital IESS de Ibarra se utiliza con mayor frecuencia el remifentanilo como primera línea de opioide en la tiroidectomía transoral asociado al sevoflurano al 1%, oxígeno al 0,6% con inducción de propofol a dosis de 2mg/kg, relajación muscular con bromuro de rocuronio a dosis de 0,6 mg/kg y analgesia multimodal con tramadol, o buprenorfina, complementado con por vía intravenosa con AINES (ketorolaco, matamizol, paracetamol) con buenos resultados y como analgesia de rescate de 50-100 mcg de fentanyl.

## Período postoperatorio

Los cuidados postoperatorios habitualmente son simples. La vigilancia se limita a una laringoscopia postoperatoria con fonación y a un control de la calcemia y de los niveles séricos de hormona paratiroidea (PTH). Los pacientes vuelven a su domicilio días después del postoperatorio, en función de los hábitos de cada centro, del entorno del paciente y de la necesidad de suplementos cálcicos en caso de hipoparatiroidismo postoperatorio. No existe ninguna justificación para la realización de una profilaxis antitrombótica, salvo en el caso de los pacientes que tengan una afección que precise la reinstauración precoz de un tratamiento anticoagulante. El dolor postoperatorio suele ser moderado durante las primeras 12 horas. El mejor tratamiento consiste en la asociación de una ALR (bloqueo cervical superficial) y de analgésicos de nivel 2<sup>5</sup>.

Los antiinflamatorios no esteroideos disminuyen la intensidad del dolor postoperatorio sin aumentar el riesgo de hemorragia y hematoma de la celda tiroidea<sup>18,19</sup>. También se pueden utilizar los antihiperalgésicos como la gabapentina. Se permite la reanudación de ingesta de líquidos y sólidos en el período inmediatamente posterior<sup>5</sup>.

## CONCLUSIONES

Un eslabón fundamental de la anestesia para tiroidectomía transoral es realizar esta intervención en condiciones eutiroidea del paciente. La preparación preoperatoria está dirigida especialmente a los pacientes hipertiroideos para prevenir el acceso tirotóxico. La técnica anestésica de elección se basa en el uso de anestesia general balanceada, o anestesia total intravenosa con o sin insuflación de CO<sub>2</sub> y monitorización no invasiva. El equipo quirúrgico, debe, paralelamente a su procedimiento de exéresis, controlar la hemostasia, la función de los nervios recurrentes y de los paratiroides, asegurando una tasa de complicaciones lo más baja posible. De forma general los cuidados anestésicos del paciente sometido a tiroidectomía transoral no difieren de las otras técnicas quirúrgicas mínimamente invasiva del tiroide.

## Referencias bibliográficas

1. Cadena E. Tiroidectomía axilar endoscópica video asistida 3D. Revista Colombiana de Cancerología. (Internet) 2017 Nov. (citado el 20 de Feb. 2017); 20(4).190-197. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rccan.2016.09.003>
2. Granell J. Introducción a la cirugía robótica en cabeza y cuello; (Internet) 2015, Oct. (citado el 01 de Ene. 2017) Disponible desde: <https://www.researchgate.net/publication/283212117>
3. Martínez R. Perfusiones de opioides en cirugía otorrinolaringológica y cirugía de cabeza y cuello. Revista Mexicana de Anestesiología. (Internet) 2015 junio (Citado el 52 de enero 2017).38(250-54). Disponible desde: <http://www.medigraphic.org.mx>
4. Velásquez S. Manejo perioperatorio del paciente para cirugía e tiroidea. Mexicana de Anestesiología. (Internet) 2007 abril-junio. (Citado 20 de enero 2017) 30(185-92). Disponible desde: <http://www.medigraphic.com/pdfs/rma/cma-2007/cmas071ae.pdf>

5. Garot M. Anestesia y reanimación en la cirugía de la glándula tiroidea. Elsevier.(Internet). 2015.Nov.(Citado 15 de Enero)41(1-10) Disponible desde: [http://dx.doi.org/10.1016/S1280-4703\(15\)73874-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1280-4703(15)73874-0)
6. Bajwa S. Anesthesia and thyroid surgery: The never ending challenges. US National Library of Medicine National Institutes of Health. (Internet) 2013 mraz.(Citado 5 de enero)17(228-34)Disponible desde: <http://www.ijem.in/article.asp?issn=2230-8210;year=2013;volume=17;issue=2;spage=228;epage=234;aulast=Bajwa>
7. Villar J. Vía clínica de tiroidectomía. Elsevier.(internet) 2015 Mayo(Citado 4 de feb);93(283-99).Disponible desde: <http://www.elsevier.es/es-revista-cirugia-espanola-36-articulo-via-clinica-tiroidectomia-S0009739X15000159>
8. Iglesias JL. NOVEDADES EN VÍA AÉREA DIFÍCIL (Internet): 1era.Ed Editorial Universidad de Salamanca España; 2016.Nov. (Citado 21 de Enero).Disponible desde: [https://books.google.es/books?hl=es&lr=lang\\_es|lang\\_en&id=LbYgDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Iglesias+JL.+NOVEDADES+EN+VÍA+](https://books.google.es/books?hl=es&lr=lang_es|lang_en&id=LbYgDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Iglesias+JL.+NOVEDADES+EN+VÍA+)
9. O'Dell K. Predictors of difficult intubation and the otolaryngology perioperative consult. Elsevier. (Internet) 2015 Junio(Citado el 25 de Enero 2017) ; 33(2). Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25999002>
10. Castelao J. Patología mediastínica. Dialnet. (Internet)2014;(Citado 7 de Feb. 2017) 11(67). Disponible desde: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4915036>
11. Puerto J. Bocio endotorácico. Presentación de dos casos. MediSur. (Internet) 2016 Octubre;(Citado el 13 de Enero 2017 14(5).Disponible desde: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-897X2016000500012](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2016000500012)
12. Rosato L, Carlevato M, De Toma G, Avenia N. Recurrent Laryngeal Nerve Damage and Phonetic Modifications after Total Thyroidectomy: Surgical Malpractice Only or Predictable Sequence? World Journal of Surgery.(Internet) 2005 Junio;(Citado 14 de Feb.) 29(6). Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15895296>
13. Echternach M, Maurer C, Mencke T, Schilling M, Verse T, Richter B. Laryngeal complications after thyroidectomy: is it always the surgeon? Medline.(Internet) 2009 Febrero;(Citado 28 de Feb 2017) 144(2).Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19221326>
14. Farrag T, Samlan R, Lin F, Tufano R. The utility of evaluating true vocal fold motion before thyroid surgery. Medline.(Internet) 2012 Febrero; (Citado 12 de Enero 2017)116(2). Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16467711>
15. Bousofara M, Raucoules A. Farmacología de las benzodiazepinas utilizadas en anestesia-reanimación. Sparrho.(Internet) 2016 Noviembre(Citado el 21 de Enero 2017)42(4):1-11Disponible desde: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1280470316807227>
16. Miller R. Miller Anestesia.(Internet) 8th ed.: España Elsevier; 2016. Marzo (Citado el 15 de Febrero de 2017).Disponible desde: <https://booksdemedicinablog.wordpress.com/2016/03/17/anestesia-de-miller-8va-edicion/>
17. Tafur L, Serna A, Lema E. Fentanilo PK/PD, un medicamento vigente. Colomb Anesteiol.(Internet) 2010 Abril; (Citado el 3 de Feb.de 2017)38(1).Disponible desde: <http://www.revcolanest.com.co/es/fentanilo-pk-pd-un-medicamento-vigente/articulo/S0120334710810056/>
18. N Akihiro ,A Hideo. Una nueva técnica transoral de la tiroidectomía endoscópica con enfoque premandible sin gas. Total Endoscopic Thyroidectomy.(Internet) 2013 Abril,(Citado el 8 de Enero 2017)27(4) P 1105-1110 Disponible desde:<https://link.springer.com/article/10.1007/s00464-012-2588-6>
19. Casanova D. Cirugía mínimamente invasiva de tiroides y paratiroides; Scielo analytic (Internet) 2012.(Citado de Enero 2017) 28(3) Disponible desde [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272005000600012](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000600012)
20. Fourcade O, Sanchez P, Kern D. Propacetamol and ketoprofen after thyroidectomy. European Society of Anaesthesiology.(Internet) 2012 Mayo;(Citado el 20 de febrero) 22(5).Disponible desde: <https://doi.org/10.1017/S0265021505000645>

**Recibido:** Marzo de 2017.

**Aprobado:** Abril de 2017.





## NOTICIAS Y OPINIONES

**Amblyrhynchus cristatus, el único lagarto marino del mundo.****Amblyrhynchus cristatus, the only sea lizard in the world.**

Odalys Torres

DOI. 10.21931/RB/2017.02.02.10

## RESUMEN

*Amblyrhynchus cristatus* perteneciente a la familia *Iguanidae* es comúnmente conocida como iguana marina. Se establece en la región insular del país dentro del Parque Nacional Galápagos. Su peculiar capacidad de alimentarse y llevar una buena parte de su vida bajo el agua, es lo que la convierte en una especie única. Los estudios realizados demuestran que esta especie sufrió importantes adaptaciones en su cuerpo que le permiten soportar los cambios de temperatura entre el ambiente y el medio acuático. La *Amblyrhynchus cristatus* se ve amenazada por la incorporación de especies introducidas al ecosistema de las islas, se ha propuesto varias alternativas para poder impulsar la conservación tanto de las especies endémicas como de su hábitat.

**Palabras Claves:** *Amblyrhynchus cristatus*, iguana marina, Galápagos, temperatura, hábitat, interacciones.

## ABSTRACT

*Amblyrhynchus cristatus* belonging to the family *Iguanidae* is commonly known as marine iguana. It is established in the insular region of the country within the Galapagos National Park. Her peculiar ability to feed herself and live a good part of her life under water, is what makes her a unique species. Studies show that this species underwent important adaptations in its body that allow it to withstand the temperature changes between the surface and aquatic environment. The *Amblyrhynchus cristatus* is threatened by the incorporation of introduced species into the ecosystem of the islands, several alternatives have been proposed to promote the conservation of endemic species and their habitat.

**Key Words:** *Amblyrhynchus cristatus*, marine iguana, Galapagos, temperature, habitat, interactions

**Introducción**

*Amblyrhynchus cristatus*, conocida comúnmente como iguana marina es una especie endémica de la región insular de la República de Ecuador, representa una figura importante dentro del desarrollo del hábitat que existen en el Archipiélago de Galápagos (Figura 1). El habitante más característico de las costas rocosas de las Galápagos es indudablemente la iguana marina, único lagarto marino viviente en el mundo. Sin duda esta especie de reptiles forma parte del grupo de vertebrados que domina la escena en las islas, cuyas características logradas por esta especie solamente las pudo obtener en este ecosistema inusualmente árido para una latitud tropical, ya que poseen un clima diferente en cada una de las islas e islotes que lo conforman<sup>1</sup>.

Este artículo busca recopilar y presentar información referente a la morfología fisiología y la correlación con el ecosistema en el que se desarrolla la *Amblyrhynchus cristatus*, además de las amenazas que sufre esta especie en relación a la acción humana y especies introducidas dentro de su ecosistema.

**Hábitat de la *Amblyrhynchus cristatus*: Parque Nacional Galápagos**

Actualmente las islas Galápagos constituyen una provincia de 12.000 habitantes aproximadamente, se convirtió en la sede de la Estación Científica Charles

Darwin, el manejo de esta zona se remonta al año 1936 con el primer Plan de Manejo del área que comprende un total de 7.995 km<sup>2</sup>, cabe recalcar que el 3% de este parque está destinado al uso y usufructo de los asentamientos humanos<sup>2</sup>. Separado de las costas ecuatorianas por 1000 km, este archipiélago formado por islas oceánicas de origen volcánico presenta dos estaciones bien marcadas: cálida y lluviosa, esta última permite el desarrollo de comunidades vegetales diferentes en cada una de las islas, la presencia de precipitaciones de 300 a 1700 mm anuales<sup>3</sup>, acompañadas de un descenso de las temperaturas. El Parque Nacional Galápagos está incluido en un archipiélago de 121 islas, islotes y rocas (Snell et al. 1995; Anexo 2), dispersos en 38.000 km<sup>2</sup> de mar interior (Plan de Manejo de la Reserva de Recursos Marinos de Galápagos, 1992), presentando un elevado endemismo y otras características biológicas y físicas únicas. Actualmente las Islas Galápagos son una de las zonas de Ecuador con su flora y fauna mejor conservada. Según *La Lista Roja* la población de iguanas marinas en las islas es difícil de calcular con certeza más se conoce poblaciones que van desde las 4,000 hasta las 30,000 dependiendo de la isla en la que desarrollaron su hábitat. Además de la *Amblyrhynchus cristatus* existe una gran cantidad de especies endémicas del PNG (Parque Nacional Galápagos) y la RNG (Reserva Nacional Galápagos), se reposta la existencia de 2,900 especies de organismos marinos, de los cuales

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

**Correspondencia:** karen.torres@yachaytech.edu.ec



**Figura 1:** Proceso de termoregulación en las costas del *Amblyrhynchus cristatus*.

encontramos 18,2% de endemismo, además de un promedio por grupo biótico de endemismo del 25%<sup>4</sup>. Entre las especies que se pueden encontrar en PNG se encuentran: *Grapsus grapsus*, *Pelecanus occidentalis*, *Cheloniidae* (*Chelonoidis nigra*), *Testudinidae*, *Phalacrocoracidae*, *Spheniscidae*, *Diamedeidae*, *Carcharhinidae* (*Carcharhinus galapagensis*). Dado que el Parque Nacional Galápagos posee una gran cantidad de especies endémica ha sido considerada como uno de los lugares con mayor importancia biológica en nuestro país.

El clima tropical de esta región insular genera un ambiente de desarrollo de especies capaces de adaptarse a las zonas áridas y semi-húmedas generadas a partir de un fenómeno frecuente de las zonas altas conocido como garúa, este término hace alusión a precipitaciones de baja intensidad. Al presentarse una gradiente de clima se puede observar zonación vegetal que comprende desde manglares hasta arbustos tolerantes de condiciones salinas, además de la presencia de helechos, juncias y hierbas<sup>1</sup>.

El aislamiento que se evidencia en las islas permite el desarrollo de características especiales en cada una de las especies que forman parte del parque, han generado una gran cantidad de adaptaciones propias del ecosistema único que se desarrolla en cada isla. Después de una evaluación de taxonomías intraespecífica se pudo determinar 7 diferentes subespecies de iguanas marinas dentro de las islas: *Amblyrhynchus cristatus ssp. albemarlensis*<sup>5</sup> *ssp. cristatus*, *ssp. hassi*, *ssp. mertensi*, *ssp. nanus*, *ssp. sielmanni*, *ssp. venustissimus*. Los efectos del Fenómeno del Niño generan un gran declive en la población de esta especie, se ha calculado una disminución del 85% de la población cada ocasión en la que este se ha presentado. Además, la población se ve afectada por la contaminación y especies introducidas que se han convertido en predadores<sup>6</sup>.

### ***Amblyrhynchus cristatus*: morfología y fisiología**

*Amblyrhynchus cristatus* proveniente de la familia iguanidae, es un reptil marino endémico de las Islas Galápagos con 10 subpoblaciones se estima que ocupan un total de 500 km<sup>2</sup>. *Amblyrhynchus cristatus* es la única iguana marina por lo que viven en las zonas rocosas de Galápagos cercanas a las costas. Son un grupo de vertebrados amniotas provistos de escamas epidérmicas

de queratina. Además, poseen una circulación incompleta y glóbulos rojos nucleados<sup>7</sup>. Una de sus características más importantes es su capacidad de permanecer bajo el mar por hasta 45 minutos. Poseen un particular hocico de punta lo cual les facilita la extracción de algas de las profundidades gracias a sus dientes afilados. Su nado se basa en una ondulación lateral de sus cuerpos, tienen colas aplanadas, garras largas y afiladas a diferencia de sus primos terrestres, esta característica les facilita la sujeción a las rocas localizadas a orillas del mar (Figura 2). Suelen en ocasiones tomar coloraciones rojizas y verdosas. Su piel dura impide la desecación y en su mayoría es impermeable al igual que la cascara de sus huevos.

Esta especie presenta un característico color negro que lo hace muy evidente en la arena de la playa pero contribuye en su camuflaje en las áreas rocosas además de permitirles una mejor absorción del calor proveniente del sol. (Fig.1) Una de las características importantes de este reptil es su sangre fría y necesitan mantener su calor corporal, por lo que suelen mantenerse juntas, comportamiento que no es común en la mayoría de reptiles<sup>9</sup>.

Las adaptaciones de estos animales les permiten diferenciar-se de las iguanas terrestres (*Conolophus subcristatus*), su coloración café y su comportamiento especialmente esquivo caracteriza a los miembros de esta especie, completamente diferente a la *Amblyrhynchus cristatus*. Pueden llegar a alcanzar un peso de 0,5 a 1,5 kg, lo cual evidencia un eficiente desarrollo de su morfología que les ha permitido tener acceso a las zonas en las que habitan y a los alimentos que forman parte de su dieta actual.

La *Amblyrhynchus cristatus* sigue el sistema regular de apareamiento de los reptiles que consiste principalmente en la búsqueda de pareja por parte de los machos, y en la disponibilidad espacial y temporal de las hembras<sup>10</sup>. Generalmente los individuos machos tienden a aparearse con varios individuos del sexo contrario durante la estación<sup>11</sup>. La monogamia en esta especie es poco frecuente. En consecuencia, la duración del emparejamiento varía mucho entre individuos de la misma especie el cual en la mayoría de los casos dura muy poco. La incubación de los huevos va desde los 86 a 120 días, mientras que la hembra se encarga del nido únicamente durante los primeros 16, estos huevos se depositan en una zona específica denominada lugar de excavación.



Figura 2: Morfología del *Amblyrhynchus cristatus* vista lateral.

Si bien es cierto no existen registros de una enfermedad que afecte a esta especie en específico, se han reportado casos de muerte de iguanas por un desajuste nutricional. Sin embargo, al ser reptiles de la familia Iguanidae podrán ser propensas a compartir patologías tales como: osteoporosis, osteodistrofia, infecciones respiratorias producto de la exposición prolongadas a temperaturas muy bajas<sup>12</sup>.

### Interacción de la *Amblyrhynchus cristatus* con el ecosistema de las islas.

Como ya se mencionó anteriormente dentro de las islas existen 7 diferentes subespecies de la *Amblyrhynchus cristatus* todo esto debido a las adaptaciones que desarrolla cada subespecie en función del ambiente en el que se desarrolla. Estas iguanas pueden llegar a vivir desde 5 a 12 años en su medio natural y durante ese tiempo contribuir al balance natural establecido en las islas por las especies endémicas que se han encontrado ahí desde los tiempos de Darwin. Estos animales duermen expuestos a las costas y en los árboles de mangle que rodean las playas. Los zoólogos especulan que la razón de las adaptaciones de esta peculiar iguana a la comida marina es debido a la escasez de comida en el territorio insular, al ser islas de origen volcánico la vegetación es escasa e inclusive en algunos casos inexistente. (Figura 3)



Figura 3: Comportamiento característico de reptiles, se agrupan para conservar calor.

### Amenazas directas al ecosistema y a la especie

La introducción de mamíferos como los perros y gatos ferales provoca la depredación y disminución de las poblaciones de esta especie endémica tanto de jóvenes como de adultos. Se han obtenido alarmantes cifras que nos muestran que la mayoría de individuos de la especie no logra llegar a la edad reproductiva. En algunas islas los gatos victimaban a gran escala a las iguanas marinas. Su investigación era en su mayor parte en la zona costera del Archipiélago. El estado actual de las islas y la disminución de las poblaciones se debe además a la gran afectación que tiene la corriente del Niño en las poblaciones de especies costeras tal como la *Amblyrhynchus cristatus*<sup>11</sup>.

Presumiblemente un programa de monitoreo de eclosión y la reducción del número de mamíferos y demás especies introducidas sería la solución ideal al problema al que se enfrenta esta especie. (Figura 4)

### CONCLUSIONES

La especie *Amblyrhynchus cristatus* es una de las principales criaturas que forman parte de los ecosistemas de las islas de for-



**Figura 4:** Proceso de alimentación del *Amblyrhynchus cristatus* de algas provenientes de los lechos marinos.

mación volcánica conocidas como el Archipiélago de Galápagos, estas son un icono de especies endémicas, dadas las adaptaciones que las especies sufren debido a las condiciones extremas a las que se someten, la especie estudiada logró desarrollar siete subespecies debido a este factor especie-ecosistema propio de cada formación insular. Forman parte importante del ecosistema que les rodea porque al ser un ambiente aislado se ha desarrollado un ecosistema único de especies endémicas que se busca no perturbar en la medida de lo posible. La *Amblyrhynchus cristatus* presenta boca puntiaguda, dientes y garras afilados y la capacidad de permanecer bajo el agua durante largos períodos de tiempo, su comportamiento pacífico y todas sus demás características convierten a esta especie en única e irremplazable en las costas insulares de La Reserva Nacional Galápagos. Todas las especies pertenecientes tanto a la reserva como al Parque Nacional Galápagos se han convertido en víctima de las especies introducidas. La implementación de planes de control y disminución del factor introducido solucionarían los grandes problemas de disminución de población de la especie, además de más control de las actividades humanas en la zona, con el objetivo de concientizar a la gente y controlar que las actividades que estos realizan para su usufructo afecten de la menor manera a los ecosistemas propios de las islas.

## Referencias bibliográficas

1. Departamento Científico de Entomología, Museo de La Plata; investigadora Independiente del CONICET. (2011). Las Islas Galápagos: Un Paraíso Amenazado. Revista Museo. Recuperado de [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/48635/Documento\\_completo.pdf?sequence=1](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/48635/Documento_completo.pdf?sequence=1)
2. Parque Nacional Reserva Marina de Galápagos Ecuador. 1996. PLAN DE MANEJO DEL PARQUE NACIONAL GALÁPAGOS. Servicio Parque Nacional Galápagos Instituto Ecuatoriano Forestal y de Áreas Naturales y Vida Silvestre. Recuperado de [http://www.miliarium.com/paginas/leyes/internacional/Ecuador/Conservacion/PNG\\_pm96\\_es.pdf](http://www.miliarium.com/paginas/leyes/internacional/Ecuador/Conservacion/PNG_pm96_es.pdf)
3. Solís, M. A. 1979. Galápagos y su naturaleza. Geografía, Ecología y Conservación. Biblioteca Ecuador. Quito.
4. Lisseth Encalada Serrano. 2013. Ecosistemas de las Islas Galápagos. Universidad de Cuenca. Recuperado de <http://es.slideshare.net/LissethEncaladaSerrano/ecosistemas-de-las-islas-galapagos>
5. Nelson, K., Snell, H. & Wikelski, M. 2004. *Amblyrhynchus cristatus* ssp. *albemarlensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T44173A10867894. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T44173A10867894.en>. Descargado el 01 de Febrero del 2017.
6. The IUCN Red List of Threatened Species: *Amblyrhynchus cristatus* – published in 2004. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T1086A3222951.en>
7. Agustín Alvear. 2013. Las Iguanas Marinas Recuperado de <https://prezi.com/wxwtwlnah3ao/las-iguanas-marinas/>
8. Galapagos Islands Tour Guide. 2003-2016. Iguana Marina de Galápagos Recuperado de <http://www.galapagos-islands-tourguide.com/iguana-marina.html>
9. Ismael Pérez Fernández. 2011. Lagartos, iguanas, tortugas y la evolución abofeteándose la cara. Recuperado de <http://naukas.com/2011/08/10/lagartos-iguana-tortugas-y-la-evolucion-abofeteandote-la-cara/>
10. POUGH, F.H., ANDREWS, R.M., CADLE, J.E., CRUMP, M.L., SAVITZKY, A.H. & WELLS, K.D. (2001): Herpetología. 2nd ed., New Jersey. Prentice Hall.
11. Linda J. Cayot, Kornelia Rassmann y Fritz TriUmich. (1994): ¿ESTAN LAS IGUANAS MARINAS AMENAZADAS EN ISLAS CON DEPREDADORES INTRODUCIDOS? Noticias de Galapagos v.51, 52, 53 Versión en Español
12. Cecilia Alvear. (2013): Las Autoridades de Galapagos Investigan Muerte de Iguanas Marinas en Tortuga Bay. Recuperado de <http://www.galapagosdigital.com/espanol/2013/09/13/las-autoridades-de-galapagos-investigan-muerte-de-iguana-marinas-en-tortuga-bay/>

**Recibido:** Enero de 2017.

**Aprobado:** Abril de 2017.

¿QUÉ ES

# ORCID?

ORCID puede ayudarle a gestionar mejor sus autores y revisores, proporcionando un registro único de identificadores permanentes para investigadores y académicos, que es abierto, no propietario, transparente, móvil y basado en la comunidad.

Todo lo que hacemos está impulsado por los datos, así que necesitamos identificadores de autor fiables. Pero no puede haber identificadores de autor fiables sin ORCID.

Paul Peters, director de estrategia en Hindawi Publishing

El sistema ORCID no sólo permite mejorar los procesos de publicación, sino que la participación de los editores también permite la mejora de los procesos para socios como los organismos de financiación y las universidades.

Craig Van Dyck, Vicepresidente de Gestión de Contenidos de Global, Global Research, Wiley

¿Cómo podemos **agilizar** nuestro proceso de presentación de manuscritos? ¿Podemos **reducir** el coste de gestionar y eliminar la ambigüedad de nuestras bases de datos de autores y revisores? ¿Cómo podemos **mejorar** la exactitud de nuestra búsqueda por autor? ¿Por qué tenemos tantos **duplicados** en los registros de autor? ¿Dónde encontramos los revisores **más cualificados**?

Las editoriales académicas y de investigación se enfrentan diariamente a problemas de autoría. Usted se esfuerza por mantener la precisión en las bases de datos de autores, que son necesarias para entender la historia de un autor, para realizar búsquedas basadas en nombres precisos, y para encontrar y gestionar los revisores. En ausencia de identificadores de autor únicos, a menudo usted se ve obligado a eliminar manualmente la ambigüedad de los metadatos para que coincidan correctamente los autores con sus artículos.

Mediante la vinculación de los investigadores y profesores con sus publicaciones, ORCID sirve como un aglutinador de información, y permite a los investigadores y editores gestionar de manera más eficiente y eficaz la difusión de resultados de investigación. ORCID le permite enlazar de forma fiable y sin ambigüedad, los autores con su producción académica completa, correcta y actual, que le ayuda a controlar sus contribuciones únicas.

id

## ORCID ayuda a los editores:

- Identificar y distinguir claramente a los autores.
- Simplificar los procesos de entrega de manuscritos.
- Encontrar rápidamente lectores y colaboradores.
- Mejorar la velocidad y precisión de búsqueda por autor.
- Mantener la conformidad con el depósito obligatorio de los resultados y los artículos de investigación.

Como organización independiente y sin ánimo de lucro diseñada para beneficiar a un amplio rango de organizaciones, ORCID es única en su capacidad para atravesar disciplinas, sectores de investigación y fronteras nacionales. La capacidad de conectar la investigación y los investigadores enriquece el proceso del descubrimiento científico y mejora la eficiencia de la financiación y la colaboración científicas. ORCID está trabajando con todos los sectores de la comunidad científica para hacer realidad esta visión.



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/>

# 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)

