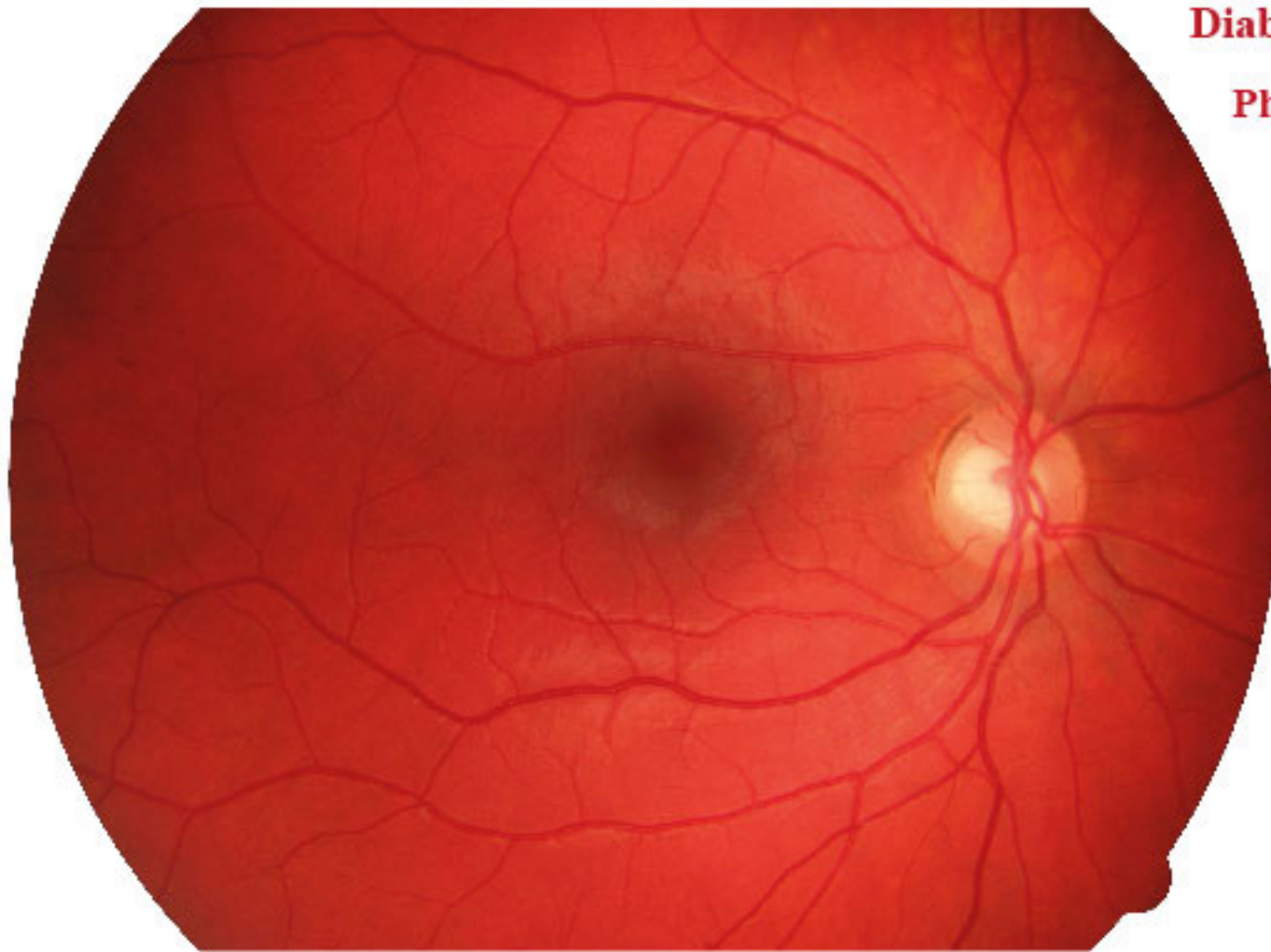


Bionatura



Diabetic retinopathy

Pharmacovigilance

Ensayos clínicos

Hepatitis B

Enfermedad de Paget Extramamaria

Antimicrobial activity of lactic acid bacteria

Hongos Micorrízicos Arbusculares

Melanosuchus niger

Suero de Leche



clinicalbiotec.com

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  [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



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 Jefe / Chief Editor

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

Editor General / Editorial Manager

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

-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 esten online se debe proveer un enlace consistente para su localización en Internet. Actualmente, no todos los documentos tienen DOI, pero si lo tienen se debe incluir como parte de la referencias. Si no tuviese DOI, incluir la URL.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Instrucciones a los autores en:
<http://revistabionatura.com/instrucciones.html>
Asistente de publicación / Publication assistant
Evelyn Padilla Rodriguez (sales@revistabionatura.com)

EDITORIAL

Generic drugs and pharmacovigilance

Medicamentos genéricos y farmacovigilancia

419

Nelson Santiago Vispo

CARTA AL EDITOR

Investigación Clínica & Ensayos Clínicos Desafíos y Perspectivas

Clinical Research & Clinical Trials Challenges and Perspectives

423

Thelvia I Ramos

RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

Prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy: A cross-sectional study in Ecuador

427

Prevalencia y factores de riesgo para retinopatía diabética: Un estudio transversal en Ecuador

Karen Sofía Flores-Mena, Kory Naima Jara-Tamayo, Paúl Herrera-González, Enrique Gea-Izquierdo

Preliminary study for the detection of pig specific antibodies against peptides obtained from PRRSV envelope proteins using Dot blot assay.

432

Estudio preliminar para la detección de anticuerpos específicos en cerdos contra péptidos obtenidos a partir de proteínas de envoltura del virus PRRS mediante un ensayo de Dot blot.

Zuniga Sanchez R., Czub M., Waeckerlin R., Mansilla Ojeda R, Camacho F², Ruiz Garrido A

Contaminación por metales pesados en el sur del Ecuador asociada a la actividad minera.

437

Contamination by heavy metals in the south of Ecuador associated to the mining activity.

Rodrigo Oviedo-Anchundia, Emy Moina-Quimí, Jaime Naranjo-Morán, Milton Barcos-Arias

Caracterización molecular y conservación de hongos del suelo asociados con la respuesta a estrés por nitrógeno

442

Molecular characterization and conservation of soil fungi associated with the stress response by nitrogen

Xiomara Recalde Rodríguez¹ Aminael Sanchez Rodríguez²

Estandarización de un ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de anticuerpos IgG contra el antígeno de superficie recombinante del virus de la Hepatitis B inducidos en conejos New Zealand.

448

Standardization of an immunoenzymatic assay for the quantification of IgG antibodies against the recombinant surface antigen of Hepatitis B virus induced in New Zealand rabbits

Yosbany Pérez-Barrios, Yisabel Aranguren-Mazorra, Caridad Zayas-Vignier, Mabel Hernández-Cedeño, Carlos Espinosa-Viñals, Yanely Tirado-Hernández, Abel Fajardo-Sánchez, Maylín Álvarez-Tito, Alex Quintero-Pérez, Dagmar Garcia-Rivera, Reinaldo Acevedo Grogues

Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas aisladas de invertebrados marinos de la costa del Chubut (Patagonia – Argentina) 456

Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from marine invertebrates of Chubut coast (Patagonia – Argentina)
Parada Romina, Beraud Lucas, Andoro Débora, Sosa Franco, Marguet Emilio y Vallejo Marisol.

REPORTE DE CASOS / CASE REPORTS

Enfermedad de Paget Extramamaria en varón. A propósito de un caso 460
Paget's disease Extramammary in male. About a case

Adrian Isacc Nieto Jiménez, Lourdes Gladys Rodríguez Ramírez, Karina Benítez Escobar

ARTÍCULO DE REVISIÓN / REVIEW

Usos potenciales de germoplasma animal masculino con fines de preservación de fauna silvestre 465
Potential use of animal male germplasm for the preservation of endangered species

Francisco Cabrera, Andrés Caicedo, Pedro M. Aponte

Valorización del suero de leche: Una visión desde la biotecnología 468
Milk whey valorization: An overview from Biotechnology

José M. Pais Chanfrau, Jimmy Núñez Pérez, Marco V. Lara Fiallos, Leonor M. Rivera Intriago, Luis E. Trujillo Toledo, Milton J. Cuaran Guerrero

NOTICIAS Y OPINIONES / NEWS AND VIEWS

DNA fingerprinting 477

Huella Genética

David Garcia and Karla Miño

La Revista Bionatura se encuentra indexada en:



INTERNATIONAL
Scientific Indexing



Red Iberoamericana
de Innovación y Conocimiento Científico



y una copia online de la versión impresa en:



EDITORIAL

Generic drugs and pharmacovigilance Medicamentos genéricos y farmacovigilancia

Nelson Santiago Vispo

DOI. 10.21931/RB/2017.02.04.1

Pharmacovigilance is a very special area of patient health care. It is defined as that science which, together with its activities related to screening, evaluation, prevention and understanding of a drug adverse effects, allows to make a better use of them in the treatment as well as prevention of diseases identifying the risks and risk factors in the shortest time possible to avoid or diminish the harm they may cause. It is based on the scientific evidence and it helps guarantee the approval and safety of public health programs.¹

Misuse of a medicine in a few patients may destroy the credibility of a drug since rumors and tales about unfavorable effects of medicines may spread quickly and are difficult to refute upon absence of good data. A good pharmacovigilance practice may generate evidence which inspires confidence and public acceptance.²

Pharmacovigilance may also provide evidence of other types of problems related to the medical practice, including the treatment failure, interactions between medicines and food, the incorrect use of medicines or fake or low-quality medicines.³

Brand name medicines are manufactured by laboratories engaged in investigating and developing these drugs. When a new medicine is created, the laboratory which developed it has a patent allowing it to market such medicine on an exclusive basis for 20 years approximately. During this term, the laboratory should recover the money invested in the investigation and development of the medicine, so that is why the price is higher. When the patent expires, other laboratories may start to manufacture their own versions of the brand name medicines, and that is how generic drugs arise, which are those containing the same active ingredient as brand name drugs, in the same substance strength, but they have a different brand name or they simply have no brand name at all, but the package only shows the name of the active ingredient and of the manufacturing laboratory.⁴

The generic version of a drug may cost up to 70% less than the original medicine. In countries where the market of generic medicines is well controlled and where their quality is assured, they are the election medicines in the health institutions and also among the people, due to the significant cost saving.⁵

For regulating agencies to consider the approval of a generic drug, they should comply with different criteria. The most important criteria are bioequivalence and bioavailability. Bioequivalence is made to evaluate comparatively the therapeutic equivalence, in vivo, between two formulations of a medicine containing the same active ingredient or drug. Bioavailability refers to the speed and level in which the active ingredient is absorbed of a pharmaceutical product. The maximum strength of a drug (C_{max}) is the standard used to characterize the absorption rate. The area under the plasma drug concentration-time curve (AUC) is the standard used to characterize the absorption degree of the drug. Bioequivalence means there is an absorption rate and degree equivalent to the same active ingredient of two or more pharmaceutical products. For a generic medicine to be approved, both the C_{max} and the AUC should vary only within a limited range compared with the brand name medicines.⁶

Safety of a generic drug depends on its quality. There are laboratories which manufacture high quality generic drugs, while other laboratories may manufacture less effective medicines, which cannot have the same effectiveness than those of the brand name. An important factor to take into account then is the current pharmacovigilance in different countries. Generic drugs should undergo strict bioavailability and bioequivalence tests with brand name drugs. Those generic drugs which pass these tests should be identified to distinguish them from similar generic drugs, the effectiveness of which is not justified. In United States, the government applies the same controls to brand name medicines and to generic drugs and inspects the laboratories of generic drugs to assure the quality of all its medicines.⁷

The main disadvantage of generic drugs is that in some countries where there are no controls or appropriate legislation, it is not possible to know how effective a certain generic drug is in comparison with the brand name medicine and, therefore, when buying generic drug, we run the risk of not getting the desired effect.

This type of low cost drugs and therefore, more easily afforded by the people, when there is no such study, causes increase of toxicity, increase of hospitalizations due to adverse events or adverse reactions and consequently, increase of deaths due to medicines without reaching a known cause. Pharmacovigilance incorporates and provides training about the identification of adverse reactions, data compilation, processing and analysis. It is important to highlight that these activities allow the identification of previously unsuspected adverse reactions, as well as the identification of their effects in pregnant women and in very young or old people who, in general, are unknown in new medicines. The gathered information also provides the tools for the effective management of problems. These include communication and risk minimization.⁸

In developed countries, the cost of adverse reactions among the general people is extremely high and of low recognition. Within the context of high morbidity charge and malnutrition in many underdeveloped countries, this cost could be proportionally higher. In any program of public health, a self-contained pharmacovigilance system should eventually result in cost savings through the early recognition and the management of these risks.⁹

Those countries which lack the facilities, experience and necessary resources for pharmacovigilance are likely to need them the most. When working to achieve this, it is important that the traditional division between the safety of medicines, on one hand, and the public health, on the other, ceases to exist. The development of pharmacovigilance within a public health program should be seen as an important opportunity for the development of a comprehensive national pharmacovigilance system in the health local service and it should be considered as a mandatory investment in the future public health of the territory.¹⁰

One pharmacovigilance strength is its worldwide nature. Under the encouragement and coordination of the World Health Organization (WHO) and its Cooperating Center for

the International Drug Monitoring (the Uppsala Monitoring Centre),¹¹ there are currently 127 national centers working on a network in a solid international program. Ecuador is a member since this year. These national centers cooperate in the WHO Program for the International Drug Monitoring, to gather reports of suspected adverse drug reactions (ADR)¹¹ and after their review, to send them to the Uppsala Monitoring Centre to be entered in the WHO database. This is the largest database of ADR reports in the world and it is main resource to generate signals of Adverse Drug Reactions (ADR) not previously recognized and for the study of questions about drug safety. This database would have an added value if it included reports on drugs used in public health programs and it could also be a useful resource for the programs themselves.¹²

Bioavailability and/or bioequivalence play a key role in the development period of drugs for new medicines

as well as for their equivalent generic drugs. For both, these studies are also important in the period after the approval in presence of certain manufacturing changes. Like many regulatory studies, the evaluation of bioavailability and bioequivalence can be usually achieved considering the following three questions. Which is the main variable of the study? Which are the tests that may be used to address the question? What confidence degree is needed for the test result? Small regulating agencies of developing countries should demand bioavailability studies and/or prove the bioequivalence for generic products during the developing process or after the approval.^{13, 14}

Pharmacovigilance may be and should be an integral part of all public health programs which use drugs to optimize the use of scarce health resources and prevent any potential tragedies.



Figure 1. Pharmacie in Paulista Avenue. In some countries, such as Brazil (photo) and France, more than 20% of all drug sales are generic. Farmacia en la Avenida Paulista. En algunos países como Brasil (en la foto) y Francia, más del 20% de los medicamentos disponibles a la venta son genéricos. By The Photographer (Own work) [CC BY-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)], via Wikimedia Commons

Medicamentos genéricos y farmacovigilancia

La farmacovigilancia en un área muy especial de la atención al paciente, se define como aquella ciencia que, junto con sus actividades relacionadas con la detección, evaluación prevención y comprensión de los efectos adversos de un medicamento permite hacer un mejor uso de los mismo en el tratamiento y prevención de las enfermedades identificando los riesgos y los factores de riesgo en el menor tiempo posible para evitar o disminuir los daños. Está basada en la evidencia científica y ayuda a garantizar la aprobación y seguridad de los programas de salud pública.¹

Un mal uso de un medicamento en unos pocos pacientes puede destruir la credibilidad de un fármaco ya que los rumores y las leyendas acerca de los efectos desfavorables de los medicamentos

pueden diseminarse rápidamente y son difíciles de refutar en ausencia de buenos datos. Una buena práctica de farmacovigilancia puede generar evidencia que inspire confianza y aceptación pública.²

La farmacovigilancia puede proporcionar también evidencias de otros tipos de problemas relacionados con la práctica médica, incluidos el fracaso del tratamiento, interacciones entre medicamentos y alimentos, el uso incorrecto de medicamentos o medicamentos falsificados y de baja calidad.³

Los medicamentos comerciales son los elaborados por laboratorios que se dedican a investigar y desarrollar estas drogas. Cuando se crea un nuevo medicamento, el laboratorio que lo desarrolló cuenta con una

patente que le permite comercializarlo en exclusividad durante 20 años aproximadamente. En ese plazo, el laboratorio debe recuperar el dinero invertido en la investigación y el desarrollo del mismo, por lo que el precio es mal alto. Cuando la patente vence, otros laboratorios pueden comenzar a elaborar sus propias versiones de los medicamentos comerciales, y es así como surgen los medicamentos genéricos, que son aquellos contienen la misma sustancia activa que los medicamentos comerciales, en la misma concentración de sustancia, pero que tienen una marca comercial distinta o simplemente no tienen marca, sino que en el empaque figura solo el nombre de la sustancia activa y el del laboratorio que lo elabora.

La versión genérica de un medicamento puede costar hasta un 70% menos que el medicamento original. En los países donde el mercado de medicamentos genéricos está bien controlado y donde se asegura la calidad de los mismos, son los medicamentos de elección en las instituciones de salud y también en la población, debido al ahorro considerable de dinero.⁵

Para que las agencias reguladoras consideren la aprobación de un genérico estos deben cumplir diferentes criterios. Los más importantes son la bioequivalencia y biodisponibilidad. La bioequivalencia se realiza para evaluar comparativamente la equivalencia terapéutica, in vivo, entre dos formulaciones de un medicamento que contiene el mismo principio activo o fármaco. La biodisponibilidad se refiere a la velocidad y al grado en que el ingrediente activo se absorbe de un producto farmacéutico. La concentración máxima de fármaco (C_{max}) es el parámetro utilizado para caracterizar la tasa de absorción. El área bajo la curva concentración plasmática del tiempo del fármaco (AUC) es el parámetro utilizado para caracterizar el grado de absorción del fármaco. La bioequivalencia significa que hay una tasa y grado de absorción equivalentes del mismo ingrediente activo de dos o más productos farmacéuticos. Para que se apruebe un medicamento genérico, tanto la C_{max} como el AUC deben variar solo dentro de un rango limitado en comparación con los medicamentos de marca.⁶

La seguridad de un medicamento genérico depende de su calidad. Existen laboratorios que elaboran medicamentos genéricos de alta calidad, mientras que otros laboratorios pueden elaborar medicinas no tan eficaces, que no logran tener la misma efectividad que los de marca comercial. Un factor importante a tener en cuenta entonces es la farmacovigilancia vigente en los distintos países. Los medicamentos genéricos deben ser sometidos a estrictas pruebas de biodisponibilidad y bioequivalencia con los medicamentos de marca. Los genéricos que pasan estas pruebas deben ser identificados para distinguirlos de los medicamentos genéricos similares, cuyo nivel de efectividad no está justificada. En Estados Unidos, el gobierno aplica los mismos controles a los medicamentos de marca y a los genéricos e inspecciona los laboratorios de genéricos para asegurar la calidad de todos sus medicamentos.⁷

La principal desventaja de los genéricos es que en algunos países donde no existen controles ni legislación adecuada, no es posible saber qué tan efectivo es un determinado genérico en comparación con el medicamento de marca y, por lo tanto, al comprar un genérico se corre el riesgo de no conseguir el efecto deseado.

Este tipo de medicamentos que resultan muy baratos

y por tanto de mayor acceso a la población, cuando no tiene este tipo de estudio provoca, aumento de la toxicidad, incremento de las hospitalizaciones por eventos adversos o reacciones adversas y por tanto un incremento de las muertes por medicamentos sin que se pueda llegar a una causa conocida. La farmacovigilancia incorpora y proporciona capacitación en la identificación de reacciones adversas, recopilación de datos, procesamiento y análisis. Es importante destacar que estas actividades permiten la identificación de reacciones adversas previamente insospechadas, así como la identificación de sus efectos en las mujeres embarazadas y en los muy jóvenes o viejos, que, en general, se desconocen en los nuevos medicamentos. La información recopilada también proporciona las herramientas para la gestión efectiva de los problemas. Estos incluyen la comunicación y la minimización del riesgo.⁸

En los países desarrollados, el costo de las reacciones adversas en la población general es muy alto y poco reconocido. En el contexto de la alta carga de morbilidad y la malnutrición presentes en muchos países subdesarrollados, este costo podría ser proporcionalmente más elevado. En cualquier programa de salud pública, un sistema de farmacovigilancia bien integrado debe, en última instancia, resultar en ahorros de costos a través del reconocimiento temprano y la gestión de estos riesgos.⁹

Es posible que los países que carecen de las instalaciones, la experiencia y los recursos necesarios para la farmacovigilancia más los necesiten. Al trabajar para lograr esto, es importante que la división tradicional entre la seguridad de los medicamentos, por un lado, y la salud pública, por el otro, deje de existir. El desarrollo de la farmacovigilancia dentro de un programa de salud pública debe verse como una oportunidad importante para el desarrollo de un sistema nacional integral de farmacovigilancia en el servicio local de salud y debe considerarse como una inversión obligatoria en la futura salud pública del territorio.¹⁰

Una fortaleza de la farmacovigilancia es su naturaleza internacional. Bajo el estímulo y la coordinación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y su Centro Colaborador para el Monitoreo Internacional de Drogas (el Centro de Monitoreo de Uppsala),¹¹ actualmente hay 127 centros nacionales trabajando en red en un programa internacional sólido. Ecuador es miembro desde este año. Estos centros nacionales colaboran en el Programa de la OMS para el Monitoreo Internacional de Drogas, para recopilar informes de reacciones sospechosas de reacciones adversas a medicamentos (ADR)¹¹ y después de su revisión, enviarlos al Centro de Monitoreo de Uppsala para ingresar a la base de datos de la OMS. Esta es la base de datos más grande de informes de ADR en el mundo y es un recurso principal para generar señales de Reacciones Adversas a Medicamentos (RAM) previamente no reconocidas y para el estudio de preguntas sobre la seguridad de los medicamentos. Esta base de datos tendría un valor agregado si incluía informes sobre medicamentos utilizados en programas de salud pública y también podría ser un recurso valioso para los programas mismos.¹

Los estudios de biodisponibilidad y / o bioequivalencia desempeñan un papel clave en el período de desarrollo de fármacos tanto para los nuevos medicamentos

como para sus equivalentes genéricos. Para ambos, estos estudios también son importantes en el período posterior a la aprobación en presencia de ciertos cambios de fabricación. Al igual que muchos estudios regulatorios, la evaluación de biodisponibilidad y bioequivalencia generalmente se puede lograr considerando las siguientes tres preguntas. ¿Cuál es la variable principal del estudio? ¿Cuáles son las pruebas que pueden usarse para abordar la pregunta? ¿Qué grado de confianza se necesita para el resultado de la prueba? Las pequeñas agencias reguladoras de los países en vías de desarrollo deben exigir los estudios de biodisponibilidad y / o demostrar la bioequivalencia para los productos genéricos durante el proceso de desarrollo o después de la aprobación.^{13, 14}

La farmacovigilancia puede y debe ser una parte integral de todos los programas de salud pública que usan medicamentos para optimizar el uso de los escasos recursos de salud y prevenir posibles tragedias.

Referencias bibliográficas

1. De Abajo Iglesias, F. J. & Madurga Sanz, M. La farmacovigilancia en una agencia de regulación de medicamentos: fines y estrategias. *Aten. Primaria* 145, 683–706 (2003).
2. Aires, B. V Conferencia Panamericana. (2008).
3. Parf, R., Técnico, D. & Armonización, R. P. De. Buenas Prácticas de Farmacovigilancia para las Américas Buenas Prácticas de Farmacovigilancia para las Américas. Washington (2010).
4. Meredith, P. Bioequivalence and Other Unresolved Issues in Generic Drug Substitution. *Clin. Ther.* 25, 2875–2890 (2003).
5. Christl, L. A., Woodcock, J. & Kozlowski, S. Biosimilars: The US Regulatory Framework. *Annu. Rev. Med.* 68, 243–254 (2017).
6. Howland, R. H. Evaluating the Bioavailability and Bioequivalence of Generic Medications. *J. Psychosoc. Nurs. Ment. Health Serv.* 48, 13–16 (2010).
7. Marcia Angel. The Truth about the Drug Companies: How they deceive us and what to do about it? Random House 329, 40–45 (2005).
8. Reiffen, D. & Ward, M. R. Generic Drug Industry Dynamics. *Rev. Econ. Stat.* 87, 37–49 (2005).
9. European Commission. Volume 9A of the Rules governing medicinal products in the European Union- Guidelines on Pharmacovigilance for medicinal products for human use. EudraLex 9, 1–229 (2011).
10. Herrera, R. & Alesso, C.-L. Farmacovigilancia hacia una mayor seguridad en el uso de los medicamentos 2012 Uppsala Monitoring Centre.
11. OMS. Portal de Información - Medicamentos Esenciales y Productos de Salud. Available at: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/>. (Accessed: 25th November 2017)
12. WHO. The Safety of Medicines in Public health programmes: Pharmacovigilance an essential tool. WHO Libr. Cat. Data 61 (2006). doi:ISBN 92 4 159391
13. Carrillo Norte, J. A. & Postigo Mota, S. [generic drugs: is bioequivalence sufficient to ensure quality, efficacy and safety?]. *Rev. Enferm.* 38, 42–5 (2015).
14. Calandra, D. M., Mauro, D. Di, Cutugno, F. & Martino, S. Di. Navigating wall-sized displays with the gaze: A proposal for cultural heritage. *CEUR Workshop Proc.* 1621, 36–43 (2016).



Dr. Nelson Santiago Vispo

Editor Revista Bionatura

www.revistabionatura.com

Email. editor@revistabionatura.com

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

CARTA AL EDITOR

Investigación Clínica & Ensayos Clínicos Desafíos y Perspectivas

Clinical Research & Clinical Trials Challenges and Perspectives

Thelvia I Ramos

DOI. 10.21931/RB/2017.02.04.2

El ensayo clínico, se considera el patrón de referencia al evaluar la utilidad de nuevos fármacos cuando se ejecuta de forma correcta, con métodos diagnósticos fidedignos que permiten el control de los posibles factores que pueden actuar de forma sistemática sesgando la respuesta o la interpretación de esta. Están dirigidos a demostrar la seguridad y la eficacia de los medicamentos y dispositivos médicos. Por lo general, son patrocinados por las empresas farmacéuticas y son conducidos por equipos de investigación que incluyen médicos y otros profesionales médicos, a su vez son controlados por los comités de bioética y las agencias reguladoras nacionales e internacionales cumpliendo estrictamente estándares de Buenas Prácticas Clínicas que permita que ese producto posteriormente pueda ser comercializado.¹

En su desarrollo histórico los estudios clínicos han contribuido al desarrollo de la medicina como ciencia. Así mismo ha favorecido al desarrollo de nuevas profilaxis, terapias novedosas y a la evolución del diagnóstico médico.

La investigación clínica al ser utilizada como información científica de fácil acceso a toda la comunidad dedicada a los estudios en seres humanos les ha permitido a los galenos poder discriminar entre la evidencia que se presenta como factible y fidedigna de aquella que presentan evidencias de poca sostenibilidad, permitiéndoles discernir entre los estudios de mal diseño y realización, de aquéllos realmente válidos y aplicables a su propia práctica. A través de este método los médicos pasan de receptores pasivos a evaluadores críticos, con influencia en la calidad de sus decisiones, lo cual se revierte en el beneficio que reciban sus pacientes.²

El desarrollo de la investigación clínica se ha basado en las últimas décadas en el control sobre la aparición de errores sistémicos (sesgos) lo cual le permite como método científico el enfoque más alto metodológicamente, al evaluar la calidad de los datos que proporcionan diversas aproximaciones metodológicas.³

Hace alrededor de 50 años la posibilidad de llegar a un método diagnóstico, o establecer una terapéutica eficaz estaba basado en la impresión clínica y la experiencia personal, más que en pruebas objetivas que confirmaran el pensamiento médico. Hoy en día los ensayos clínicos constituyen una forma de análisis biológico altamente científico, diseñado para medir la eficacia de un tratamiento, con una posterior correspondencia en la práctica habitual y con una adecuada eficiencia de ese producto. Estos estudios son los experimentos más complejos, pues se realiza en pacientes a los que se le somete a un tratamiento con propósitos experimentales, cuya respuesta se desconoce; y al realizarse en seres humanos tienen una serie de implicaciones éticas que imponen limitaciones en su desarrollo. Es un método

para comparar objetivamente, a través de estudio de carácter prospectivo, los resultados de dos o más procedimientos terapéuticos.⁴

No es coincidencia hoy que “la tasa de mortalidad ajustada por edad en los EE.UU. para la enfermedad coronaria se redujo a la mitad de 1980-2000”, porque gran parte de este progreso fue el resultado de invertir en la investigación básica y clínica. De hecho, si bien la mitad de la disminución se atribuye a reducciones en los niveles de colesterol, presión arterial y tabaquismo, la otra “mitad de esta disminución puede atribuirse directamente a terapias médicas validadas en ensayos clínicos”. La mayor parte de estos ensayos fue posible debido a los recursos gastados en el desarrollo clínico de nuevas terapias, las cuales han sido proporcionadas por compañías farmacéuticas, biotecnológicas y de dispositivos médicos.⁵

Los críticos de los ensayos clínicos creen que son innecesarios, los “experimentos” impulsados por los beneficios seres humanos. Lo que estas personas no se dan cuenta es que los médicos no siempre saben qué tratamiento es mejor para sus pacientes y esto hace necesario establecer de manera individual el balance beneficio y riesgo. Como resultado, los médicos recomiendan a los pacientes las opciones de los estudios clínicos para una patología dada cuando no están claros de cuales opciones de tratamiento que se está probando sea la mejor para él. Las pacientes a su vez no deben ser renuentes a ser voluntarios para los ensayos clínicos, porque como muestra la historia, han salvado la vida de millones de personas.

Por tales motivos, así como se ha ido perfeccionando la metodología para realizar estos estudios y obtener la mayor y más confiable evidencia científica, se han desarrollado los aspectos regulatorios que hoy en día tienen un carácter global. El desarrollo de los medicamentos y la investigación clínica se encuentran entre las actividades más reguladas a nivel mundial. A medida que ha mejorado nuestra comprensión de la fisiopatología y se incrementan las posibilidades de implementar nuevos tratamientos, se ha elevado también la complejidad de los requerimientos para elaborar los protocolos en los ensayos clínicos, junto al aumento de la normativa regulatoria en cada país que desarrolla este tipo de actividad.⁶

Con el transcurso del tiempo, para cubrir las necesidades de poder contar con nuevas dianas terapéuticas, la investigación clínica ha impuesto la necesidad de acortar los ciclos de desarrollo de los nuevos medicamentos y esto ha ocasionado un desplazamiento de los ensayos clínicos promovidos por la industria farmacéutica desde los continentes con mayor desarrollo en esta área como Norteamérica, Europa y Australia a continentes que incluyen países de Europa del Este, Sudamérica y Asia.

Pudiéramos plantearnos la interrogante de si se hace necesario o no, que los países con bajos recursos económicos o en vías de desarrollo se lleven a cabo este tipo de investigación y que repercusión positiva pudiera tener en la práctica médica habitual.

La globalización, el avance de la ciencia junto con el desarrollo tecnológico y los cambios sociales son las tres aristas que están marcando el futuro de la investigación clínica. Los estudios clínicos constituyen la encrucijada por la que todos los avances biomédicos tienen que pasar antes de convertirse en un beneficio social. Esta investigación debe estar asociada al conocimiento y la incorporación del mismo: mientras más sea la participación, mayor la integración del conocimiento y mayor la capacidad para medir las innovaciones o no, en un momento dado. Además, constituye una obligación de las administraciones de salud y los ministerios públicos que este tipo de ensayo puedan realizarse en los diversos países para poder proveer mayores opciones terapéuticas a su población.⁷

Los beneficios para los profesionales científicos, así como para el sistema de salud también son notables. Disponer de un sistema de salud dedicado a la investigación clínica, con procedimientos eficientes para llevarla a cabo, establece un elemento esencial para el desarrollo de productos innovadores que permita alternativas más eficientes a los ya existentes en el mercado. Investigación clínica no es más que conocimiento y este solo se traduce en el mejor uso de las innovaciones. Debemos recordar también el impacto de la investigación en el sector industrial a partir de la fortaleza de su sector científico, que atraerá investigación clínica de calidad. Fortalecimiento de las áreas de Investigación para el desarrollo de Investigación y Desarrollo (I+D) de calidad.⁸

Con respecto a los beneficios para los pacientes, es la única posibilidad de acceder a productos innovadores de manera precoz por ejemplo el caso de las enfermedades raras y los medicamentos huérfanos.⁹ La disponibilidad de centros en sus lugares de residencia con habilidades para este tipo de afecciones, incrementaría la probabilidad de que sean tratados con mayor éxito. Detrás de cada medicina e intervención que la gente ha tomado, hay miles de pacientes que se han ofrecido voluntariamente para participar en ensayos clínicos, que han conducido a muchos avances en la prevención de enfermedades y el tratamiento en el último medio siglo. Sin la voluntad de estos individuos, muchos habrían sufrido. También es importante reconocer que la investigación clínica no siempre se dedica a encontrar la siguiente super-droga, aportan también información invaluable sobre los beneficios y la seguridad de las terapias existentes, proporcionando a los médicos y pacientes información confiable para elegir entre tratamientos alternativos.⁹

Pudiéramos considerar asimismo como beneficio de la investigación clínica la posibilidad de contar cada vez más, con la personalización frente a la estandarización, lo cual representa otro fenómeno social, la promesa de la medicina personalizada.¹⁰ Cada vez contamos con más estudios que se apoyan en los biomarcadores que responden a perfiles poblacionales y que permiten abaratar los costos, afinar mucho más su proceso de desarrollo de nuevos medicamentos y maximizar las posibilidades de éxito. Pero debemos tener cuidado con el término pues una mala utilización de la medicina personalizada o de los biomarcadores puede suponer un serio riesgo en la solución de determinados problemas de salud.¹¹

Observando el contexto global actual pudiéramos también evaluar cómo se está moviendo la investigación clínica en nuestro planeta. Los países más representativos en investigación clínica por continente son: EE.UU. y Canadá en América del Norte; Europa Alemania y Francia; Asia China y Corea; Oceanía Australia y Nueva Zelanda; América Latina Brasil, África Sudáfrica y Egipto, aunque en estos últimos países no son tan numerosos si podemos observar que a medida que estos continentes y dentro de ellos sus países van transitando hacia el desarrollo se incrementan el número de ensayos clínicos que realizan.¹²

El registro de ensayos clínicos a nivel mundial a noviembre de 2017 corresponde a 258,784. América del Norte y el resto de

los países con mayor participación con 92,341 (36%) y 121,750 (47%) respectivamente.¹³ Si comparamos estas mismas cifras para el 2016 podemos concluir que estas cifras van en ascenso, y en la última década, otros continentes se han ido incorporando como es el caso del continente asiático con gran participación, lo cual sugiere este incremento dado por su desarrollo y diversidad étnica.^{14,15}

Dentro de los tipos de intervenciones que más se están presentando se encuentran las drogas o biológicos, de los cuales ya se han registrado 122,901, seguidos por ensayos conductuales y otros 62,460, procedimientos quirúrgicos 22,113 y dispositivo médicos 24,957.¹⁶

Se puede observar al analizar de manera global todas estas cifras que se está promoviendo una transición en cuanto a la realización de los ensayos clínicos, los cuales se están perfilando cada vez más hacia países emergentes como es el caso de India y Sur América. El pronóstico para el 2020 nos indica que los estudios clínicos aún en su mayoría serán conducidos en países desarrollados pero que hay un porcentaje elevado de los mismos que se llevarán a cabo en países emergentes. Entre estos países, China, se presenta como el líder del grupo con el mayor crecimiento en los siguientes 5-7 años.¹⁷

Por todo lo antes expuesto la industrialización de los ensayos clínicos está provocando un desplazamiento relativo de la investigación clínica hacia países no occidentales, aunque países como los Estados Unidos aún lideran esta actividad. Todo este movimiento es consecuencia de la necesidad que tiene la industria de disponer de un mayor número de pacientes incluidos y poder realizar ensayos competentemente grandes, con velocidad activa en el reclutamiento y manteniendo lo más bajo posibles los costos de estas investigaciones.

La importancia de realizar investigaciones médicas en una plataforma global o internacional no puede ser exagerada en los tiempos actuales. Los patrocinadores están alentando los ensayos clínicos internacionales por una serie de razones una de ellas la gran heterogeneidad de la muestra que incrementa la representatividad de las diversas poblaciones y nos ahorramos el tiempo de entrar el nuevo fármaco a cada país con un ensayo clínico Fase III para demostrar los niveles de toxicidad y seguridad para esa población. A nivel mundial, los ensayos clínicos están bajo una creciente presión para cumplir las metas de reclutamiento de pacientes de forma rápida y eficiente, a veces con recursos muy limitados.¹⁸

La realización de ensayos clínicos en múltiples países aumenta el acceso a los sujetos de estudio potencialmente elegibles. Es razonable creer que los ensayos internacionales se completarán más rápida y eficientemente, lo que conducirá a un avance vertiginoso en la ciencia y la conservación de recursos específicos de investigación. El rápido desarrollo en la ciencia puede reducir la carga de la enfermedad, promover la salud, y extender la longevidad para todas las personas. Además, la generalización, una de las metas de la medicina translacional, se incrementará al reclutar pacientes de múltiples países y múltiples etnias. Además, la mejora de la salud global puede ser posible cuando ciertos tipos de ensayos clínicos se llevan a cabo en países que de otro modo no tendrían acceso a un medicamento innovador o intervención. Existen además una serie de dificultades para los países desarrollados como es el caso del encarecimiento de los estudios, los largos plazos para la aprobación de los ensayos, las dificultades en el reclutamiento y las particularidades de los criterios de inclusión y exclusión, las exigencias regulatorias, la disyunción entre la investigación clínica y la práctica médica habitual, y la globalización de la investigación clínica.¹⁹

Por todos estos motivos los países latinoamericanos deben incorporarse con más fuerza al desarrollo de la investigación clínica en nuestro continente, independientemente de las ventajas tanto en experiencia para los médicos y personal científico como para los pacientes. Son una herramienta de investigación clave para avanzar el conocimiento médico y la atención al paciente.²⁰

América Latina está en condiciones de incorporarse con mayor vehemencia a la investigación clínica. Ofrece un suministro de médicos altamente capacitados con estándares de formación médica altos y sitios bien equipados para la realización de ensayos clínicos. Profesionales con formación en estudios clínicos son parte de una comunidad respetada que intercambia experiencia clínica y científica. La experiencia ha demostrado que los sitios de investigación proporcionan datos de forma fiable de alta calidad en el plazo requerido. En general, los médicos están dispuestos a participar en ensayos clínicos porque la oportunidad trae avances médicos a sus pacientes, ofrece prestigio profesional, y es una fuente adicional de ingresos.

Los ensayos clínicos, ayudan a mejorar y avanzar en la atención médica. También pueden ayudar a los responsables de la toma de decisiones en la atención de la salud a dirigir los recursos a las estrategias y tratamientos que mejor funcionen.²¹

Referencias bibliográficas

1. Directiva 2001/20/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 4 de abril de 2001, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros sobre la aplicación de buenas prácticas clínicas en la realización de ensayos clínicos de medicamentos de uso humano. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?ur=CONSLEG:2001L0020:20090807:ES:PDF>. Consultado el 10 de noviembre junio de 2017.
2. Juan José Calva-Mercado, M.C., M.Sc. Estudios clínicos experimentales. salud pública de México / vol.42, no.4, julio-agosto de 2000.
3. Laporte, J.R. 1993. Principios básicos de investigación clínica. Astra-Zeneca. Barcelona.
4. Joan-Ramón Laporte. Principios básicos de la investigación clínica. 2da Edición 2010 files.sld.cu/cdfc/files/2010/02/principios_basicos_inv_clin.pdf
5. Prevalence of Coronary Heart Disease --- United States, 2006—2010. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6040a1.htm>
6. Sandra L. Alfano, PharmD, FASHP, CIP. Conducting Research with Human Subjects in International Settings: Ethical Considerations. Yale J Biol Med. 2013 Sep; 86(3): 315–321.
7. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [Internet] [Accessed 2012 Oct 9]. Available from: <http://www.ich.org/>
8. Proyecto BEST. Investigación Clínica en Medicamentos. BD-Metrics. Datos y Análisis 13.ª Publicación. Disponible en <http://www.medicamentos-innovadores.org/sites/default/files/medinnovadores/Espa%C3%B1ol/Informe%20BEST/Informes%20semestrales/2012/Resultados%20BDMetrics%2013%C2%AA%20publicaci%C3%B3n.pdf>. Consultado el 18 de junio de 2013.
9. Haffner ME, Whitley J, Moses M. Two decades of orphan product development. Nat Rev Drug Discov. 2002; 1: 821-5.
10. Hansson SO. Experiments before science – what science learned from technological experiments. In: Hansson SO (ed) The role of technology in science. Philosophical perspectives 2014. Dordrecht: Springer, in press.
11. Williams DDR, Garner J. The case against “the evidence”: a different perspective on evidence-based medicine. Brit J Psychiat 2002;180:8–12.
12. Hayashi K, Masuda S, Kimura H. Analyzing global trends of biomarker use in drug interventional clinical Studies. Drug Discov Ther. 2012; 6: 102-7.
13. Clinicaltrials.gov. (2017). Studies on Map- ClinicalTrials.gov. [Sitio en inter-net] Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/search/map?map=SA> [Fecha de consulta Nov. 2017].
14. Clinicaltrials.gov. (2017). Studies on Map- ClinicalTrials.gov. [Sitio en inter-net] Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/search/map?map=SA> [Fecha de consulta Nov. 2017]
15. Chu S, Kim E, Jeong S, Park G. Factors associated with willingness to participate in clinical trials: a nationwide survey study. BMC Pub Health [Internet]. 2015;15 (1):10. Recuperado a partir de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4306240&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
16. Clinicaltrials.gov. (2017). Studies on Map- ClinicalTrials.gov. [Sitio en inter-net] Disponible en: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/resources/trends> [Fecha de consulta Nov. 2017].
17. Markets, R.(2016). New Trends in the 2015 Global Clinical Development Outsourcing Market. [Sitio de internet] Pnewswire.com. Disponible en: <http://www.pnewswire.com/news-releases/new-trends-in-the-2015-global-clinical-development-outsourcing-market-300109576.html> [Fecha de consulta Jun. 2016]
18. Greg Minisman, MA1, Minal Bhanushali, MD2, Robin Conwit, MD2, Gil I Wolfe, MD3, Inmaculada Aban, M.S., Ph.D1, Henry J Kaminski, MD4, and Gary Cutter, Ph.D1. Implementing Clinical Trials on an International Platform: Challenges and Perspectives. J Neurol Sci. 2012 February 15; 313(1-2): 1–6. doi:10.1016/j.jns.2011.10.004.
19. Sertkaya A, Birkenbach A, Berlind A, Eyraud J. Examination of clinical trial costs and barriers for drug development. U.S. Department of Health and Human Services. Assis Secret Plan Eval(ASPE); 2014.
20. <http://www.phrma.org/science/progress-in-treating-disease>
21. Thelvia I. Ramos, MD, MSc, Karina Alexandra Castro, MSc, Luis Santiago Escalante. Advances in Clinical Research in Ecuador. Therapeutic Innovation & Regulatory Science. Vol 51, Issue 3, 2017

Dra. Thelvia I. Ramos

MD. Especialista en Genética Clínica y Molecular. M.Sc. en Biotecnología Mención Ensayos Clínicos. Universidad de las Fuerzas Armadas-ES-PE. Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

REALIZAMOS PRUEBAS EN:

- Microbiología
- Parasitología
- Marcadores Tumorales
- Biología Molecular
- Citología Vaginal
- Coagulación y Hemostasia
- Endocrinología
- Hematología
- Inmunología
- Bioquímica Clínica
- Uroanálisis
- Toxicología y Drogas
- Citometría de Flujo
- Micología



PBX.: 3 945 120

PBX.: 3 945 120

INVESTIGACIÓN + DOCENCIA + SERVICIO

www.zuritalaboratorios.com

www.zuritalaboratorios.com

contacto@zuritalaboratorios.com

contacto@zuritalaboratorios.com

RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

Prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy: A cross-sectional study in Ecuador

Prevalencia y factores de riesgo para retinopatía diabética: Un estudio transversal en Ecuador

Karen Sofía Flores-Mena¹, *, Kory Naima Jara-Tamayo², *, Paúl Herrera-González³, Enrique Gea-Izquierdo⁴

* Both authors contributed equally to this study.

DOI. 10.21931/RB/2017.02.03.4

ABSTRACT

Diabetes mellitus type 2 is one of the most prevalent diseases that cause dependency and disability, so its early diagnosis prevents future complications. More than 90% of blindness is preventable with strict systemic and ophthalmologic treatment. The objective of this study is to determine the prevalence and risk factors of diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients between 30 and 60 years. Cross-sectional study analyzing age, sex, presence and duration of diabetes, unaware of being diabetic, high blood pressure, glycosylated hemoglobin, dyslipidemia, metabolic control and pharmacological treatment. Sample of 292 patients selected by simple random sampling from the Ophthalmology Service at San Francisco Hospital in Quito was determined. The prevalence of diabetic retinopathy was 21% (5% proliferative and 95% non-proliferative). There was a statistically significant association between diabetic retinopathy and age [prevalence ratio (95% CI): 8.14 (3.70-17.90), $p=0.00$], total cholesterol [prevalence ratio (95% CI): 7.43 (0.98-56.17), $p=0.01$], dyslipidemia [prevalence ratio (95% CI): 3.31 (0.96-11.38), $p=0.04$], metabolic control [prevalence ratio (95% CI): 4.57 (1.36-15.26), $p=0.00$], pharmacological treatment [prevalence ratio (95% CI): 46.88 (20.65-106.38), $p=0.00$] and use of insulin [prevalence ratio (95% CI): 41.10 (11.70-144.49), $p=0.00$]; on the other hand, there is no statistically significant association with sex, duration of disease, unaware of being diabetic, high blood pressure, glycosylated hemoglobin, triglycerides, HDL-C and LDL-C. The age, presence of dyslipidemia, metabolic control and diabetic treatment are risk factors that promote the development of diabetic retinopathy; so they must be taken into account from the first medical appointment for early detection, timely treatment and if necessary refer to the specialist.

Keywords: diabetic retinopathy, diabetes mellitus type 2, risk factors, metabolic control

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 es una de las enfermedades más prevalentes que causa dependencia e incapacidad, por lo que su diagnóstico temprano evitará complicaciones futuras. Más del 90 % de ceguera por esta enfermedad es evitable, con un tratamiento sistémico y oftalmológico estricto. El objetivo de este estudio es determinar la prevalencia y los factores de riesgo de retinopatía diabética en pacientes diabéticos tipo 2 entre 30 y 60 años. Estudio transversal con análisis de edad, sexo, presencia y duración de diabetes, desconocimiento de la enfermedad, presión arterial alta, hemoglobina glicosilada, dislipidemia, control metabólico y tratamiento farmacológico de diabetes; en una muestra de 292 pacientes escogidos mediante muestreo aleatorio simple en el Servicio de Oftalmología del Hospital San Francisco de Quito. La prevalencia de retinopatía diabética encontrada fue del 21 % (5 % proliferativa y 95 % no proliferativa). Se evidenció una relación estadísticamente significativa entre retinopatía y edad [prevalence ratio (95% CI): 8.14 (3.70-17.90), $p=0.00$], colesterol total [prevalence ratio (95% CI): 7.43 (0.98-56.17), $p=0.01$], dislipidemia [prevalence ratio (95% CI): 3.31 (0.96-11.38), $p=0.04$], control metabólico [prevalence ratio (95% CI): 4.57 (1.36-15.26), $p=0.00$], tratamiento farmacológico [prevalence ratio (95% CI): 46.88 (20.65-106.38), $p=0.00$] y uso de insulina [prevalence ratio (95% CI): 41.10 (11.70-144.49), $p=0.00$]; por otra parte no se obtuvo asociación significativa con sexo, duración de enfermedad, desconocimiento de ser diabético, presión arterial alta, hemoglobina glicosilada, triglicéridos, HDL-C y LDL-C. La edad, dislipidemia, control metabólico y tratamiento de diabetes son factores de riesgo que promueven el desarrollo de retinopatía diabética; por lo que deben ser analizados desde la primera cita para una detección precoz, tratamiento oportuno y de ser necesario referir al especialista.

Palabras clave: Caryophyllales, Cactaceae, *Hylocereus ocamponis*, *Hylocereus triangularis*, cultivo in vitro, estrés abiótico, reguladores de crecimiento vegetal, plasticidad fenotípica en plantas.

Introduction

Diabetes mellitus type 2 (DM2) is a chronic disease that has advanced in the last decade in occidental societies, causing variation in degrees of dependency. According to World Health Organization (WHO) the affected population during 2000 were 170 million people and for the year 2014, 422 million adult people were diabetic¹.

Around 3.7 million diabetic patients passed away in 2012 and 43% affected people under 70 years old. In addition, the percentage of deaths attributable to DM2 in this group is higher

in low and middle-income countries than in high-income. Based on the Ecuadorian Institute of Statistics and Censuses (INEC), since 2011 DM2 is the first cause of death in the country with a 7.15% of all of them².

Diabetic retinopathy (DR) is a leading cause of new cases of visual loss among working-age worldwide. The prevalence for DR for adults with DM2 age 40 and older in the United States is 28.5% (4.2 million people); worldwide, the prevalence rate has been estimated at 34.6% (93 million people)³.

1 Sangolquí Hospital, Sangolquí, Ecuador.

2 Julio Andrade Health Center, Tulcán-Carchi, Ecuador.

3 San Francisco de Quito Hospital, Quito, Ecuador.

4 Pontifical Catholic University of Ecuador, Research Unit & Faculty of Medicine, Quito, Ecuador.

Correspondence: PhD Enrique Gea-Izquierdo, Faculty of Medicine, Avenida 12 de octubre 1076, Vicente Ramón Roca, Quito, Ecuador. Email: enriquegea@yahoo.es

The Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) has made an evolutionary classification of DR that divided it into an early stage named as non-proliferative retinopathy (NPDR) and a severe level named proliferative retinopathy (PDR)⁴.

A quarter of the diabetic population is affected by any level of DR and 5% have a severe degree. DR is responsible of 10% of new cases of blindness every year, with a risk of development 25 times higher about this complication compared to the rest of the population.

Half of patients with DM2 presented PDR with more of 15 years of illness. According to the Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy (WESDR), the prevalence of PDR is low during the first five years of DM2 diagnosis, although the risk of disease progression is directly proportional to the duration⁵.

The United Kingdom Prospective Diabetic Study (UKPDS)⁶ found that a level less than 7% of glycosylated hemoglobin is associated with a minor progression of the illness. Additionally, the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)⁷ established that a controlled glycosylated hemoglobin reduced 76% risk of ocular damage, 50% renal complications and 60% neurological illness.

In consistency with UKPDS, controlled levels of blood pressure (BP) in hypertensive patients reduced 37% microvascular complications, 34% progression of the DR and 47% visual impairment. In addition, people with a systolic blood pressure (SBP) higher than 140 mmHg presented three times more risk of developing DR.

During the first years of DM2, no symptoms are presented, then most of the patients show complications at the time they present them. At 10 years of DM2, 35 to 40% of patients present DR. At 20 years, 80% of them have it.

The purpose of this study is to examine the prevalence and risk factors for DR in patients with DM2 between 30 and 60 years.

Methods

Subjects

Between January 2013 and January 2015, a cross-sectional study was conducted in the Ophthalmology Service at San Francisco Hospital in Quito (Republic of Ecuador), located in a northern area of the city. A total of 1337 patients from 30 to 60 years old, including diabetic and non-diabetic people, who had been attended at this service and not presented any previous ophthalmological disease neither comorbidities as immunosuppression or collagenopathy, were analyzed. Medical records without complete information were excluded. 292 people were selected by random sampling, medical records were reviewed obtaining data like age, sex, presence and duration of DM2, presence or absence of DR according to the ocular fundus, unaware of being diabetic, blood pressure (analyzing the SBP and diastolic BP (DBP)), pharmacological treatment and personal background of hypertension and laboratory results such as glycosylated hemoglobin (HbA1c), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C). Other variables were analyzed, as the duration of being diabetic with a cutoff > 10 years for longer diabetic status; and the ignorance of being diabetic at the moment of the DR diagnosis. All patients gave their informed consent prior to their inclusion in the study.

According to Adult Treatment Panel III (ATP III) and the American Heart Association, a person is diagnosed with dyslipidemia when presents a total cholesterol ≥ 200 mg/dl, triglycerides ≥ 150 mg/dl, low HDL-C < 40 mg/dl in males and < 50 mg/dl in female or LDL ≥ 100 mg/dl. Patients with dyslipidemia were classified into four groups: isolated hypercholesterolemia when the patient only presented a total cholesterol higher than 200 mg/dl, isolated hypertriglyceridemia when the level of triglycerides was higher than 150 mg/dl, mixed dyslipidemia when the level of two of the followings were altered: total cholesterol, HDL-C, LDL-C and triglycerides; and HDL-C deficit when the value of this parameter was below the cutoff based on the sex.

Patients on antihypertensive drugs or with diagnosis of hypertension or BP level $\geq 140 / \geq 90$ mmHg were assumed to be hypertensive. Referring to glycosylated hemoglobin the cutoff for normal level was 7% (53 mmol/mol). Patients with abnormal levels of BP or laboratory tests were cataloged as bad metabolic control, otherwise as good metabolic control.

According to pharmacological treatment, the use of insulin was determining. It was not considering exercise and dietetic control. The type of DR were categorized by the severity scale of ETDRS4: NPDR and PDR.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with the software package SPSS version 21 for Windows and Epi Info version 7. Distribution of qualitative variables was compared by Pearson chi-square test and Fisher's exact test.

Ethics statement

The study was conducted with the approval from the Research Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Ecuador. In addition, San Francisco de Quito Hospital delegated to the same Committee the approval of this study.

All procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008. Informed consent was obtained from all patients for being included in the study.

Results

Female constituted 51.37% of the sample and male 48.63%. People from 51 to 60 years old were the majority group representing 53.08%. Most of the patients presented normal blood pressure level (SBP ≤ 140 mm Hg: 65.75%, DBP ≤ 90 mm Hg: 72.60%), although 39.04% had a diagnosis of hypertension or were on an anti-hypertension treatment. 30.14% were diabetic and 21% of them had findings in their ocular fundus compatible with RD (5% PDR and 95% NPDR).

Regarding dyslipidemia, 76.37% of the patients presented it, being the most frequent mixed dyslipidemia with 43.50%, followed by isolated hypertriglyceridemia 24.21%, HDL-C deficit 17.49% and isolated hypercholesterolemia 14.80%.

In addition, 62.5% of the diabetic patients had high level of HbA1c; 46.59% showed a longer DM2 duration. Finally, 39.77% did not know their condition as diabetic at the time of the DR diagnosis.

According to the type of DR, all patients with PDR were older than 59 years old; on the other hand, patients with NPDR had an average age of 54 years old, even though it was found in patients since 30 years old.

Duration of 10 years or more of being diabetic is presented in 54.39% of patients with NPDR and 100% of PDR.

A higher level of HbA1c was found in 63.16% of patients with NPDR and the entire group of PDR.

NPDR patients with dyslipidemia were 85.97%. Meanwhile, patients with bad metabolic control were 94.74% of NPDR group and 100% of PDR group.

Female population presented 66.67% of the cases of PDR, 53.33% were diabetic for more than 10 years, 52.67% showed a high level of HbA1c and 82.67% had a bad metabolic control. On the other hand, male population showed 33.33% of the cases of PDR, 38.03% of them had DM2 for more than 10 years, 46.48% reported a high level of HbA1c and 84.51% had a bad metabolic control. In contrast, in NPDR the major group was represented by female (52.63%) versus male (47.37%).

Demographic data, selected clinical and laboratory findings for patients by sex, DM2 and DR are shown in Table 1.

Table 1.- Demographic data and selected clinical and laboratory findings for patients by DR, sex and DM2

	Sex		Diabetic		DR		Type of DR	
	Female n=150	Male n=142	Yes n=88	No n=204	Yes n=60	No n=28	PDR n=3	NPDR n=57
<i>AGE (years)</i>	48.79 ± 9.70	47.32 ±9.76	48.85 ±9.55	47.74 ±9.84	54.60 ± 4.34	36.54 ±4.85	59.00 ±0.72	54.37 ± 4.34
<i>DURATION OF DIABETES</i>								
< 10 years (%)	46.67	61.97	53.41	-	43.33	75	0	45.61
> 10 years (%)	53.33	38.03	46.59	-	56.67	25	100	54.39
<i>IGNORANCE OF BEING DIABETIC</i>								
Yes (%)	18.48	48.89	39.77	-	30	60.61	33.33	29.82
No (%)	81.52	51.11	60.23	-	70	39.29	66.67	70.18
<i>PERSONAL BACKGROUND OF HYPERTENSION</i>								
Yes (%)	39.33	38.73	32.95	41.67	36.67	25	33.33	36.84
No (%)	60.67	61.27	67.05	58.33	63.33	75	66.67	63.16
<i>SBP</i>								
< 140 mm Hg (%)	65.33	66.20	70.45	63.73	66.67	78.57	100	64.91
> 140 mm Hg (%)	34.68	33.80	29.55	36.27	33.33	21.43	0	35.09
<i>DBP</i>								
< 90 mm Hg (%)	76	69.01	72.72	72.55	66.67	85.71	66.67	66.67
> 90 mm Hg (%)	24	30.99	27.23	27.45	33.33	14.29	33.33	33.33
<i>HbA1c</i>								
< 7 % (%)	47.33	53.52	37.50	-	35	42.86	0	36.84
> 7 % (%)	52.67	46.48	62.50	-	65	57.14	100	63.16
<i>TOTAL CHOLESTEROL</i>								
< 200 mg/dl (%)	64.67	69.01	64.75	67.65	60	75	33.33	71.40
> 200 mg/dl (%)	35.33	30.99	35.25	32.35	40	25	66.67	38.60
<i>TRIGLYCERIDES</i>								
< 150 mg/dl (%)	51.33	51.41	40.91	55.88	46.66	28.57	66.67	45.61
> 150 mg/dl (%)	48.67	48.59	59.09	44.12	53.34	71.43	33.33	54.39
<i>HDL-C</i>								
Low (%)	31.33	33.80	46.60	26.47	50	39.29	66.67	49.12
High (%)	68.67	66.20	53.40	73.53	50	60.71	33.33	50.88
<i>LDL-C</i>								
< 100 mg/dl (%)	50.67	74.79	47.73	61.66	43.33	57.14	33.33	43.86
> 100 mg/dl (%)	49.33	35.21	52.27	38.24	56.67	42.86	66.67	56.14
<i>DYSLIPIDEMIA</i>								
Yes (%)	76	76.76	87.50	71.57	86.67	89.29	100	85.96
Mixed dyslipidemia (%)	42.10	44.95	45.45	42.47	48.08	40	33.33	48.98
Isolated	25.44	22.94	22.08	25.34	13.46	40	0	14.29
hypertriglyceridemia (%)	15.78	19.27	22.08	15.07	25	16	33.33	24.49
HDL-C deficit (%)	16.68	12.84	10.39	17.12	13.46	4	33.33	12.24
Isolated	24	23.24	12.50	28.43	13.33	10.71	0	14.04
hypercholesterolemia (%)								
No (%)								
<i>TYPE OF METABOLIC CONTROL</i>								
Good control (%)	17.33	15.49	4.65	21.57	5	3.57	0	5.26
Bad control (%)	82.67	84.51	95.45	78.43	95	96.43	100	94.74
<i>TREATMENT</i>								
Yes (%)	22.67	13.38	60.23	0	70	39.29	66.67	70.18
Insulin (%)	47.05	42.11	45.28	-	50	27.27	100	47.5
Others (%)	52.95	57.89	54.72	-	50	72.73	0	52.5
No (%)	77.33	86.62	39.77	100	30	60.71	33.33	29.82

The prevalence of DR was 21%. There were a statistically significant association between DR and age [prevalence ratio (95% CI): 8.14 (3.70-17.90), $p=0.00$], total cholesterol [prevalence ratio (95% CI): 7.43 (0.98-56.17), $p=0.01$], dyslipidemia [prevalence ratio (95% CI): 3.31 (0.96-11.38), $p=0.04$], metabolic control [prevalence ratio (95% CI): 4.57 (1.36-15.26), $p=0.00$], pharmacological treatment [prevalence ratio (95% CI): 46.88 (20.65-106.38), $p=0.00$] and use of insulin [prevalence ratio (95% CI): 41.10 (11.70-144.49), $p=0.00$]. Table 2 shows the prevalence ratio, statistical test and significance for all the variables.

Table 2.- Prevalence ratio, statistical test and significance

Variables	Value	Prevalence ratio		Statistical test		Significance (a) p-value
		95% confidence intervals		Fisher's exact test (b)	Pearson chi-square test (c)	
		Lower limit	Upper limit			
Age	8.14	3.70	17.90		34.20	0.00
Sex	1.10	0.63	1.95		0.12	0.73
Personal background of hypertension	0.88	0.49	1.59		0.18	0.67
SBP	0.95	0.52	1.73		0.02	0.87
DBP	1.43	0.78	2.64		1.34	0.25
Total cholesterol	7.43	0.98	56.17	5.10		0.01
Triglycerides	1.27	0.72	2.24		0.67	0.41
HDL-C	1.80	0.79	4.08		2.00	0.16
Dyslipidemia	3.31	0.96	11.38		3.98	0.04
Type of metabolic control	4.57	1.36	15.26	7.19		0.00
Treatment	46.88	20.65	106.38		136.65	0.00
Insulin	41.10	11.70	144.49	71.79		0.00

(a) $p < 0.05$: statistically significant

(b) If the sample is too small and there are theoretical values under 5 in at least one box

(c) All boxes have an expected value higher than 5

Discussion

DR is one of the most important causes of visual loss worldwide and is the principal cause of impaired vision in patients between 25 and 74 years old. Visual loss from DR may be secondary to macular edema (retinal thickening and edema involving the macula), hemorrhage from new vessels, retinal detachment, or neovascular glaucoma.

The results of this investigation clearly demonstrate that age, dyslipidemia, metabolic control and pharmacological treatment for DM2 are major risk factors that promote the development of DR.

Based on international literature, people between 50 to 70 years old represent 65% of DR and adults younger than 50 years old just a 10%; this information has different results in the present investigation due to 51.02% of the sample were adults from 51 to 60 years old, representing the entire group of patients with PDR. Furthermore, 17.57% of patients between 30 to 49 years old, presented abnormal findings in the ocular fundus compatible with NPDR; showing that changes can be observed in younger people, highlighting the need to perform a fundus examination periodically.

Regarding dyslipidemia, there are several investigations that link it with the progression of DR because of its relation with the development of retinal hard exudates and diabetic maculopathy^{9,10}, results that were affirmed in this study. Previous ETDRS analyses found elevated serum lipids are risk factors for concurrent presence and subsequent development of retinal hard exudates, which were associated with decreased visual acuity. The obtained results indicate that elevated lipids, most notably total cholesterol, are also a risk factor for the development of high-risk PDR with a statistically significant association. This finding may provide additional motivation for lowering elevated lipid levels in patients with DR.

According to the treatment, data in this study reveals that the use of insulin increase the progression of DR with a statistically significant association. This controversial topic is supported by some investigations that show that while hyperglycemia was a risk factor for the progression of retinopathy in all patients, change of treatment from oral drugs to insulin was associated with a 100% increased risk of retinopathy progression; on the other hand, insulin therapy is the indicated one for some patients and nowadays one of the alternative methods of delivering insulin that have been studied is insulin eye drops^{11,12}.

The other investigated variables did not show association with the development of DR, even though there are some important aspects to highlight. Based on DCCT and UKPDS the intensive glycemic control is associated with a minor prevalence of microvascular complications, so levels of HbA1c less than 7% (53 mmol/mol) reduce the DR progression to 54%¹³. The results in this investigation did not prove an association between these variables, thus to only one value of HbA1c during a year was taken into account. While lower glycosylated hemoglobin levels are associated with a decreased risk of retinopathy development and progression, good glycemic control does not guarantee that retinopathy will not develop or preclude regular screening for DR.

Duration of illness is another factor that is strongly related to the generation of DR^{14,15}. Most investigations prove that 77.8% of DR cases are presented in people with more than 15 years of being diabetic; a duration less than 5 years shows that 24% of them have some suggestible changes for DR¹⁶. However, this study describes that 43.33% of diabetic patients showed changes in their ocular fundus in less than 10 years of illness duration, with an association that was not statistically significant. Therefore, when baseline retinopathy was carefully assessed and included in multivariate models, duration of diabetes was usually no longer a risk factor for progression demonstrating that it cannot develop DR by itself. All patients with PDR had 10 years' duration of DM2, therefore the supreme importance of an adequate treatment and periodic ophthalmological controls.

A half of patients with DR worldwide did not know their diabetic condition, proportional with 58.33% obtained in this study. This data demonstrates that if a person ignores the illness state, exercise and nutritional measures will not be taken into account causing a fast progression of microvascular complications. Therefore, preventive medicine and screening are fundamental for the diagnosis and early treatment to avoid future complications.

Less than a half percent of patients was hypertensive with a normal BP at the moment of the diagnosis of DR. According to the physiopathology the maintained high BP by itself can produce vascular damage causing the progression of DR^{17,18}. The available evidence supports a beneficial effect of intervention to reduce BP preventing DR for up to 4 to 5 years¹⁹, but unfortunately the association in this study was not relevant.

Present findings support the view that DR is developed by risk factors such as age, total cholesterol, dyslipidemia, type of metabolic control, treatment and use of insulin. All of them should be paramount factors from the first appointment in order to make early detection, timely treatment and if necessary refer to the specialist.

These findings also support the suggestion that the risk for retinopathy progression may be reduced by lowering elevated serum lipids.

Based on this research, the main motivation for further studies is to determine new risk factors that could promote the development of DR and, above all, be able to apply this knowledge in diabetic patients in order to prevent this microvascular complication.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. WHO. Global report on diabetes. 1st Ed. France: 2016, p 1-87.
2. American Diabetes Association. 2015. Statistics about Diabetes. Downloaded on November 7th 2016. (<http://www.diabetes.org/diabetes-basics/statistics/?referrer=https://www.google.com/?referrer=http://www.diabetes.org/diabetes-basics/statistics/>).
3. INEC. 2013. Anuario de estadísticas vitales: nacimientos y defunciones 2013. Downloaded on November 8th 2016. (http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Poblacion_y_Demografia/Nacimientos_Defunciones/Publicaciones/Anuario_Nacimientos_y_Defunciones_2013.pdf).
4. Chew E, Klein M, Ferris F, Remaley N, Murphy R. Association of elevated serum lipid levels with retinal hard exudate in diabetic retinopathy: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) Report 22. *Arch Ophthalmol* 1996; 114(9):1079-84.
5. Klein R, Knudtson MD, Lee KE, Gangnon R, Klein BEK. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy XXII. The twenty-five-year progression of retinopathy in persons with type 1 diabetes. *Ophthalmology* 2008; 115(11):1859-68. DOI: 10.1016/j.ophtha.2008.08.023.

6. UKPDS. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ* 1998; 317(7160):703-13. DOI: 10.1136/bmj.317.7160.703

7. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329:977-86. DOI: 10.1056/NEJM199309303291401

8. Dehghan MH, Katibeh M, Ahmadi H, Nourinia R, Yaseri M. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy in the 40 to 80-year-old population in Yazd, Iran. *J Diabetes* 2015; 7(1):139-41. DOI: 10.1111/1753-0407.12205

9. European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation, Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, et al., ESC Committee for Practice Guidelines (CPG) 2008-2010 and 2010-2012 Committees. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J* 2011; 32(14):1769-1818. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr158

10. Liu L, Yue S, Wu J, et al. Prevalence and risk factors of retinopathy in patients with or without metabolic syndrome: a population-based study in Shenyang. *BMJ open* 2015; 5(12). DOI: 10.1136/bmjopen-2015-008855

11. Zhao C, Wang W, Xu D, Li H, Li M, Wang F. Insulin and risk of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus: data from a meta-analysis of seven cohort studies. *Diagnostic Pathology* 2014; 9(2): 130. DOI: 10.1186/1746-1596-9-130.

12. Vieira-Potter V, Karamichos D, Lee D. Ocular Complications of Diabetes and Therapeutic Approaches. *Biomed Res Int* 2016; 20(16): 3. DOI: 10.1155/2016/3801570

13. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, et al., Meta-Analysis for Eye Disease (META-EYE) Study Group. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2012; 35(3):556-64. DOI: 10.2337/dc11-1909

14. Hammes HP, Welp R, Kempe HP, Wagner C, Siegel E, Holl RW, DPV Initiative-German BMBF Competence Network Diabetes Mellitus. Risk factors for retinopathy and DME in type 2 diabetes-results from the German/Austrian DPV Database. *PLoS One* 2015; 10(7). DOI: 10.1371/journal.pone.0132492

15. Ahmed RA, Khalil SN, Al-Qahtani MA. Diabetic retinopathy and the associated risk factors in diabetes type 2 patients in Abha, Saudi Arabia. *J Family Community Med* 2016; 23(1):18-24. DOI: 10.4103/2230-8229.172225

16. Gao L, Xin Z, Yuan MX, Cao X, Feng JP, Shi J, et al. High prevalence of diabetic retinopathy in diabetic patient's concomitant with metabolic syndrome. *PLoS One* 2016; 11(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0145293

17. Arguedas JA, Leiva V, Wright JM. Blood pressure targets for hypertension in people with diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 10. DOI: 10.1002/14651858.CD008277.pub2

18. James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eight Joint National Committee (JNC 8). *JAMA* 2014; 311(5):507-20. DOI: 10.1001/jama.2013.284427.

19. Iglesias R, Barutell L, Artola S, Serrano R. Resumen de las recomendaciones de la American Diabetes Association (ADA) 2014 para la práctica clínica en el manejo de la diabetes mellitus. *Diabetes Práctica* 2014; 5(2):124.

Received: 8 agosto 2017

Accepted: 1 november 2017

RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

Preliminary study for the detection of pig specific antibodies against peptides obtained from PRRSV envelope proteins using Dot blot assay.

Estudio preliminar para la detección de anticuerpos específicos en cerdos contra péptidos obtenidos a partir de proteínas de envoltura del virus PRRS mediante un ensayo de Dot blot.

Zuniga Sanchez R¹, Czub M¹, Waeckerlin R¹, Mansilla Ojeda R², Camacho F², Ruiz Garrido A³.

DOI. 10.21931/RB/2017.02.04.4

ABSTRACT

Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus (PRRSV) is found worldwide being responsible for one the largest economic losses in the swine industry. Currently, different immunological assays are being used to detect specific anti-PRRSV antibodies, however they have some deficiencies. As an example of this is the ELISA test that usually does not work well with small molecules because it generally absorbs peptides larger than 15-20 residues in length. This study was conducted for the detection of specific antibodies in field pig sera against PRRSV using small synthetic peptides by Dot Blot assay. Those peptides were obtained from the envelope protein GP5 of PRRSV type 1 and type 2. Each sera sample was diluted using a range from 0.000625 to 0.005. The level of concordance between the results obtained by Dot-blot and commercial ELISA for pig categories oscillated from discrete to moderate against peptides. Sows showed higher antibody titers than younger pigs towards all peptides, being more noticeable against GP5 P1.

It was demonstrated that Dot-blot assay is a valuable technique for detecting specific antibodies against small synthetic peptides.

Keywords: PRRSV, pigs, Dot-blot, antibodies, synthetic peptides, envelope proteins.

RESUMEN

El Síndrome reproductivo respiratorio porcino conocido como PRRSV, posee una distribución mundial y genera una de las mayores pérdidas económicas dentro de la industria porcina. Actualmente diferentes ensayos inmunológicos se utilizan para la detección de anticuerpos específicos contra el virus de PRRS, sin embargo, estos presentan diversas deficiencias. Un ejemplo, es el test de ELISA, en el cual moléculas pequeñas no se adhieren correctamente a la placa, debido a que esta última absorbe péptidos que posean entre 15-20 residuos de aminoácidos. Este estudio fue realizado con el objetivo de detectar anticuerpos específicos en cerdos contra péptidos de pequeño tamaño, mediante un ensayo de Dot blot. Estos péptidos fueron sintetizados en base a la proteína GP5 del virus PRRS tipo 1 y 2. Los sueros fueron diluidos en un rango desde 0.000625 hasta 0.005. El nivel de concordancia entre los resultados obtenidos mediante Dot blot y ELISA comercial por cada categoría animal fue de discreto a moderado contra los péptidos. Las cerdas mostraron mayores títulos de anticuerpos hacia todos los péptidos, siendo esto más marcado para el péptido GP5 P1. Se demostró que el ensayo de Dot blot es una valiosa técnica, la cual permite identificar anticuerpos específicos en cerdos, utilizando péptidos de pequeño tamaño.

Palabras clave: PRRSV, cerdos, Dot-blot, anticuerpos, péptidos sintéticos, proteínas de envoltura.

Introduction

The reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is caused by a RNA virus which affects pigs of all ages and is responsible for one of the largest economic losses in the swine industry in North America.¹ The structural organization of PRRSV is based on a Nucleocapsid (N) protein, membrane protein (M), glycosylated envelope proteins (GP2a to GP5), E protein and the ORF5a protein.² GP5 is the most variable protein of the virus and is responsible for the lack of immunological cross-reaction between North American (NA) and European (EU) strains. PRRSV structural proteins play an important role for inducing an early antibody response in pigs during day 5 to 10 post infection (PI). This response is mainly directed against N

protein but also toward envelope protein.³ The first antibodies detected during PRRSV infections are IgM around day 5-7 PI and different subclass of IgGs are detected in serum around day 7-14 PI.⁴ Studies have demonstrated that virus-neutralizing antibodies (NAbs) may inhibit the replication of virus in alveolar macrophages and high titers of these antibodies in serum can clear the virus from the blood.⁵ The main target for NAbs is GP5 in which it has been discovered the major neutralizing epitope (NE) called Epitope B founded in both PRRSV strains. This fact leads the synthesis of small peptides based on Epitope B, in order to promote the production of NAbs by B cells.⁶

¹ Virology, and Emerging Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada, T2N 4Z6.

² Pharmacology Department, Faculty of Biological Sciences, Universidad de Concepcion, Concepcion, Chile, 4030000.

³ Pathology and Preventive Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Universidad de Concepcion, Chillan, Chile, 3820000.

Corresponding Author: zunigaroxana5@gmail.com

Currently, several immunological assays are being used to detect specific anti-PRRSV antibodies. Indirect fluorescent antibody test (IFA) and Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are examples of the most used in North America. Nevertheless, all those assays show disadvantages, for example IFA presents unknown sensitivity for individual animals, it is not automated; thus, it is difficult to perform on a large number of samples. On the other hand, even though ELISA has high specificity and good sensitivity it has been reported individual unexpected positive results in seronegative herds which elicit an unacceptable level of false-positives cases in commercial ELISAs.⁷ In addition, ELISA in general has low binding for small molecules since generally absorbs peptides larger than 15-20 residues.⁸

Dot-blot assay represents a good alternative for this preliminary study to detect specific antibodies in field pig sera against small synthetic peptides that represent linear epitopes from protein GP5. Dot-blot is a sensitive, specific and easy technique to perform and as employs a nitrocellulose membrane with small pore size to immobilize antigens, it is not needed of carrier larger proteins for high binding of small peptides.⁹

In this work, it was identified specific antibodies against small peptides that were synthesized based on the sequence of epitope B of protein GP5 from North American and European strain of PRRSV using a Dot blot assay. The antibody response from different pig categories were analyzed toward each peptide and those results were compared to commercial ELISA.

Materials and Methods

Synthetic peptides

Peptides from GP5 were synthesized based on published sequences for the genes encoding PRRSV structural glycoproteins (Table 1). These sequences were collected into a database (Geneious Pro 5.5, Biomatters, New Zealand), homology was determined on a nucleotide and amino acid level, and conserved sites in the PRRSV structural glycoproteins were selected. Their exposure to the immune system was predicted in silico by the 3D protein structure (HHPred, Max-Planck-Institute for Developmental Biology, Tübingen, Germany). Each peptide sequence (9 to 10-mer peptides) representing potentially immunogenic epitopes were chosen and were commercially synthesized (CanPeptide, Pointe-Claire, QC, Canada).

Table 1. Summary of synthetic peptides. NA: North American strain EU: European strain.

	Sequence	Position (aa)	Strain	Molecular Weight (KDa)	Charge at pH 7	Water Solubility	Company
GP5 P1	MRCSHKLGRF	1-10	EU	1234.52	3	Good	Peptide 2.0
GP5 P3	HKLGRFLTP	5-14	EU	1068.29	2.1	Good	Peptide 2.0
GP5 P12	ELNGTDWLKD	49-61	NA	1580.7	-2	Good	Peptide 2.0
GP5 P29	FLDITKGRLY	144-153	NA	1225.46	1	Good	Peptide 2.0

Pig serum samples

Twenty-eight pig serum samples with known PRRS-serostatus with a commercial ELISA (IDEXX, Westbrook, ME) belonging to 4 pig farms from the province of Alberta, Canada were screened

against the peptides using a Dot-blot assay (Table 2). The sera came from three different pig categories: 20 from sows (6 PRRS-positive and 4 negative), 7 grower pigs (5 PRRS-positive and 2 negative) and 9 finisher pigs (6 PRRS-positive and 3 negative). A positive-PRRSV grower pig was used as positive control and serum sample from a newborn piglet belonging to negative farm was selected as the negative control.

Swine sera screening against peptides through Dot blot assay

Protran BA79 Nitrocellulose Blotting Membrane 0.1µm (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) assembled in Bio-Dot Microfiltration System (Bio-Rad, Hercules, CA) was coated with 100 ng/well of peptides and incubated at 4°C overnight. Membrane was blocked adding bovine albumin serum (BSA) 1% in TBS buffer for 1 hour (h) at room temperature (RT). Swine sera from all pig categories were diluted in Log2 serial dilutions from 1:200 to 1:1600 and pre-adsorb in BSA 5% during 1 h at RT. Consequently, wells were incubated with 100ul of the pig sera at 37°C during 1 h. Rabbit anti-pig IgG (Sigma-Aldrich, St Louis, MO 63103 USA) was diluted 1:4000 in PBS buffer and 100 ul/well of the conjugated antibody was added to the membrane and incubated at 37°C for 1 h. ECLTM was added for color development with an incubation time of 5-10 minutes. Color intensity was measured using VersaDoc™ MP 4000 Imaging System, (Bio-Rad, Hercules, CA), and the analysis was performed using software Quantity One®.

Data analysis

Data obtained from software Quantity One® was analyzed to calculate the cut-off value for the samples based on the negative control. It was established that samples with intensity values (intensity*mm²) 3.5 times greater or equal than negative control were considered positive. On the other hand, concordance level between Dot blot and commercial ELISA was determined by calculating Kappa index, through the program VassarStats.

Comparison between commercial ELISA and Dot Blot results by animal category against GP5 P1, GP5 P3, GP5 P12 and GP5 P29

The results showed that sows category exhibited a higher level of concordance (kappa index between 0.55 to 0.60) with commercial ELISA results, in comparison to the other two pig categories which obtained a level of concordance between discrete to moderate. Finisher pigs showed the lowest level of concordance with a Kappa index of 0.25 (Table 3).

On the other hand, there was not a significant difference between the level of concordance in sows per peptide. In grower pigs the lowest concordance was observed for peptide GP5 P3 and finisher pigs exhibited the same level of concordance for all peptides (Table 3).

Table 2. Individual serum samples organized based on pig category (sows, grower and finisher pigs) and antibody PRRSV status (positive and negative).

Animal ID	Pig Category	Commercial ELISA Results
A3	Sow	Positive
C2	Sow	Positive
A2	Sow	Positive
A1	Sow	Positive
B1	Sow	Positive
C1	Sow	Positive
A4	Sow	Negative
B2	Sow	Negative
D1	Sow	Negative
C3	Sow	Negative
B4	Grower pig	Positive
A6	Grower pig	Positive
A5	Grower pig	Positive
A7	Grower pig	Positive
B3	Grower pig	Positive
D3	Grower pig	Negative
D2	Grower pig	Negative
C5	Finisher pig	Positive
B5	Finisher pig	Positive
A8	Finisher pig	Positive
B7	Finisher pig	Positive
B6	Finisher pig	Positive
A9	Finisher pig	Positive
D5	Finisher pig	Negative
D6	Finisher pig	Negative
C4	Finisher pig	Negative
Positive Control	Grower pig	Positive
Negative Control	Newborn piglet	Negative

The difference between the results obtained in this study and the commercial ELISA can be attributed to the different cut off point used in each assay. Cases of false-negative and even the amount of antibodies present in the sample it can also be involved in those results. Some studies have been reported differences between results obtained with one or other assay even using the same antigen for both of them. This could be attributed to the fact that each assay differs in the protein tested (N protein in ELISA and GP5 in Dot-blot) thus, specific antibodies against GP5 P1, GP5 P3, GP5 P12 and GP5 P29 may have been detected by Dot-blot assay in those samples that resulted to be positive in this study but originally were negative by the commercial ELISA. Differences between the sensitivity and specificity in each assay, it can also be associated to those results.^{9,10}

Results and Discussion

Comparison between positive pig's categories toward peptides

The results for GP5 P1 described that sows showed higher antibody titers than grower and finisher pigs because it was the only pig category from which 50% of the samples reacted positively to the peptide from the lowest concentration of serum tested (0.000625). Also, it was observed that only against GP5 P1, the percentage of positive sows decreased when swine sera were more concentrated therefore may be the detection capacity of the Dot-blot assay reaches a point from where the system is saturated because of a high concentration of GP5 P1 or the high concentration of sera (Figure 1a).

In contrast, the results for GP5 P3 showed that not only sows reacted positively from concentrations of serum of 0.000625, but also grower and finisher pigs were positive against the peptide. These group of pigs also exhibited higher antibody titers as well as the sows. Nevertheless, the percentage of sows that were positive from that concentration is still higher than the younger pigs (Figure 1b).

Table 3. Level of concordance between commercial ELISA results and Dot-blot results per animal category against GP5 P1, GP5 P3, GP5 P12 and GP5 P29. + (Positive); - (Negative); * (positive and negative concordant samples in both tests). Kappa: < 0 (No concordance); > 0.00 - 0.20 (Insignificant); 0.21 - 0.40 (Discrete); > 0.41 - 0.60 (Moderate); 0.61 - 0.80 (Substantial); 0.81 - 1.00 (Almost perfect).

ELISA Results	Dot-blot Results									
	Sows			Grower pigs			Finisher pigs			
	+	-	Total	+	-	Total	+	-	Total	
GP5 P1	+	5*	1	6	5*	0	5	5*	1	6
	-	1	3*	4	1	1*	2	2	1*	3
	Total	6	4	10	6	1	7	7	2	9
	Kappa	0.58			0.59			0.25		
GP5 P3	+	6*	0	6	4*	1	5	5*	1	6
	-	2	2*	4	1	1*	2	2	1*	3
	Total	8	2	10	5	2	7	7	2	9
	Kappa	0.55			0.3			0.25		
GP5 P12	+	5*	1	6	5*	0	5	5*	1	6
	-	1	3*	4	1	1*	2	2	1*	3
	Total	6	4	10	6	1	7	7	2	9
	Kappa	0.58			0.59			0.25		
GP5 P29	+	5*	0	5	5*	0	5	5*	1	6
	-	2	3*	5	1	1*	2	2	1*	3
	Total	7	3	10	6	1	7	7	2	9
	Kappa	0.6			0.59			0.25		

In GP5 P12 it was found that 50% of positive sows exhibited higher antibody titers than grower and finisher pigs. Half of the grower pigs (50%) and most finisher pigs (57.14%) were positive to that peptide from higher concentrations. In addition, there was none grower and finisher pig that reacted positively from concentration of serum of 0.000625 to this peptide (Figure 1c).

Finally, results for GP5 P29 showed that sows exhibited higher antibody titers than the other pig categories. Forty percent of positive sows reacted positively against GP5 P29 from concentration of serum of 0.000625 and a small percentage of grower pigs were positive from the same concentration (Figure 1d).

In general, at least for all peptides it was found a positive sow from the lowest concentration of serum tested (0.000625). Sows exhibited higher antibody titers than younger pigs toward all peptides.

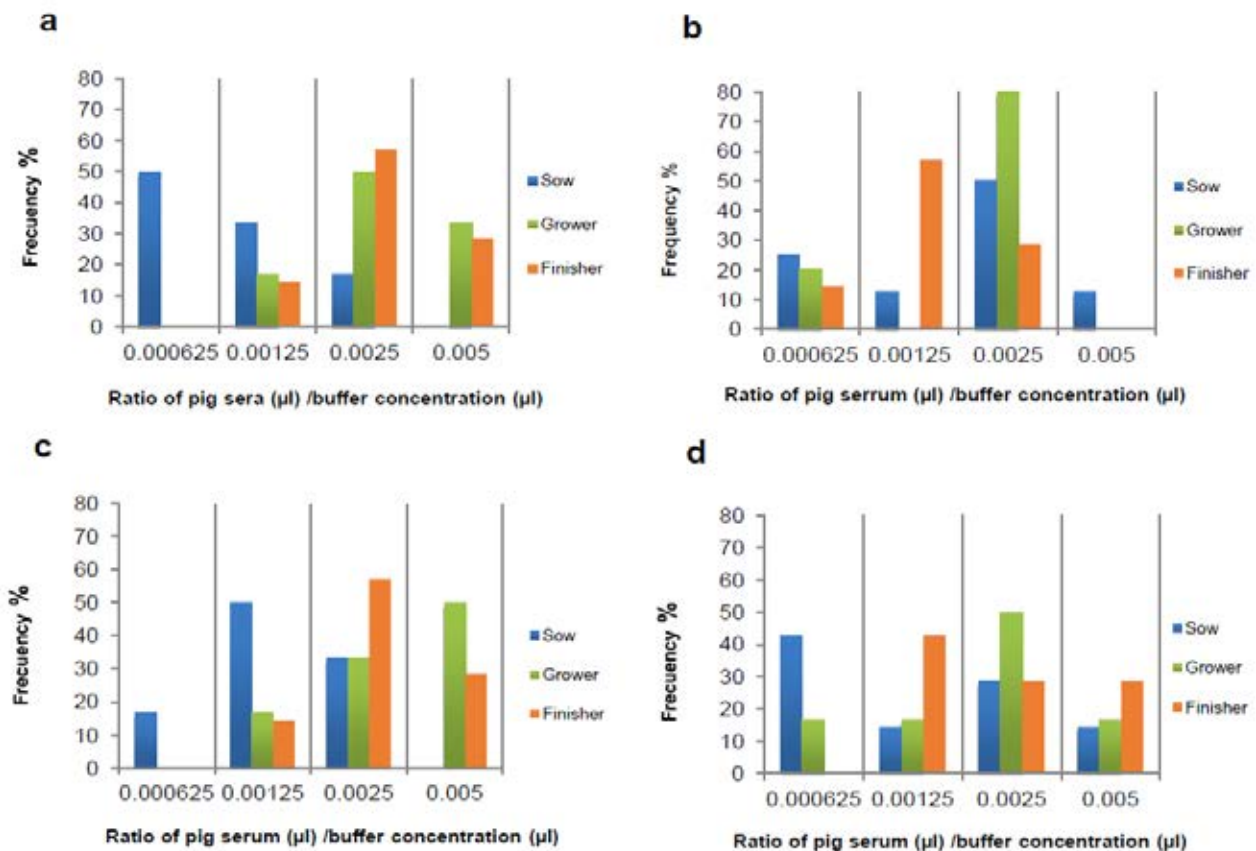


Figure 1. Percentage of positive pigs to the lowest ratio of pig sera/buffer concentration from different age groups tested against GP5 P1 (a), GP5 P3 (b), GP5 P12 (c) and GP5 P29 (d).

These results suggested that age of pigs may be involved in the amount of antibodies contained in serum. This could be explained because sows had a longer productive life than grower and finisher pigs, thus they have been exposed to different types of pathogens during their lives. Older animals have a more developed immune system capable of elicit a better response than young animals against pathogens.¹¹

A study performed by Klinge et al. 2009¹² where it was assessed whether age of pigs is involve or not in the resistance to PRRSV, suggested that older pigs can mount a faster and better immune response against the virus. Those animals showed higher antibody titers than younger ones

On the other hand, the results in this work also showed that from concentrations of serum of 0.0025, all pig categories (over 20% of the samples) reacted positively to all peptides which can suggest that this concentration could be the optimal to use in future screening using those pig categories. This can be supported by previous studies performed in ELISAs where have been tested concentrations of problem sera of 0.0025 obtaining good results.^{13,14}

The level of concordance between Dot blot and commercial ELISA results for sows was higher than those obtained in the

Conclusions

other pig's categories. Furthermore, specific antibodies against the peptides GP5 P1, GP5 P3, GP5 P12 and GP5 P29 were detected using Dot-blot assay, nevertheless those results require also be compared with other assays. Finally, as sows needed less concentration of serum to be positive toward all peptides, it may suggest that they presented higher antibody titers than younger pigs. However, due to the small number of samples used in this study it will be considered to assay a higher n in a future work.

References

- Holtkamp, D. J., Lin, H., Chong Wang, H. L., O'Connor, A. M. (2012) Identifying questions in the American association of swine veterinarian's PRRS risk assessment survey that are important for retrospectively classifying swine herds according to whether they reported clinical PRRS outbreaks in the previous 3 years. *Preventive Veterinary Medicine*, 106:42–52.
- Wissink, E. H., Kroese, M. V., van Wijk, H. A. R., Rijsewijk, F. A. M., Meulenber, J. J. M., Rottier, P. J. M. (2005) Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Virology*, 79:12495–12506.

3. Kimman, T. G., Cornelissen, L. A., Moormann, R. J., Rebel, J. M. J., Stockhofe-Zurwieden, N. (2009) Challenges for Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine*, 27:3704–3718.
4. Murtaugh, M. P., Xiao, Z., Zuckermann, F. (2002) Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunology*, 15:533–547.
5. Thaa, B., Sinhadi, B. C., Tiesch, C., Krause, E., Veit, M. (2013) Signal peptide cleavage from GP5 of PRRSV: A minor fraction of molecules retains the decoy epitope, a presumed molecular cause for viral persistence. *Plos One*, 8:1–14.
6. Van Breedam, W., Van Gorp, H., Zhang, J. Q., Crocker, P. R., Delputte, P. L., Nauwynck, H. J. (2010) The M/GP5 glycoprotein complex of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner. *Plos One*, 6:e1000730.
7. Horter, D. C., Pogranichniy, R. M., Chang, C.-C., Evans, R. B., Yoon, K.-J., Zimmerman, J. J. (2002) Characterization of the carrier state in Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Veterinary Microbiology*, 86:213–228.
8. Dubois, M. E., Hammarlund, E., Slifka, M. K. (2012) Optimization of peptide-based ELISA for serological diagnostics: A retrospective study of Human Monkeypox infection. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 12:400–409.
9. Agudelo-Florez, P., Palacio, L. G. (2009) Dot blot para el diagnóstico de la cisticercosis porcina. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 28:1077–1084.
10. Cervantes-Landin, A. Y., Martínez-Martínez, I., Reyes, P. A., Shabib, M., Espinoza-Gutiérrez, B. (2014) Estandarización de la técnica Dot-ELISA para la detección de anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi y su comparación con ELISA y Western blot. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 32:363–368.
11. Eriksen, L., Lind, P., Nansen, P., Roepstorff, A., Urban, J. (1992) Resistance to *Ascaris suum* in parasite naïve and naturally exposed growers, finishers, and sows. *Veterinary Parasitology*, 41:137–149.
12. Klinge, K. L., Vaughn, E. M., Roof, M. B., Bautista, E. M., Murtaugh, M. P. (2009) Age-dependent resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in swine. *Virology journal*, 6:177–188.
13. Johnson, C. R., Yu, W., Murtaugh, M. P. (2007) Cross-reactive antibody responses to nsp1 and nsp2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*, 88:1184–1195.
14. Roques, E., Girard, A., St-Louis, M.-C., Massie, B., Gagnon, C. A., Lessard, M., Archambault, D. (2013) Immunogenic and protective properties of GP5 and M structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressed from replicating but non-disseminating adenovectors. *Veterinary Research*. 44:1–17.

Received: 18 September 2017

Accepted: 15 November 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/>

Contaminación por metales pesados en el sur del Ecuador asociada a la actividad minera.

Contamination by heavy metals in the south of Ecuador associated to the mining activity.

Rodrigo Oviedo-Anchundia,¹ Emy Moína-Quimi,¹ Jaime Naranjo-Morán,¹ Milton Barcos-Arias¹

DOI. 10.21931/RB/2017.02.04.5

RESUMEN

En este trabajo se realizó una recopilación de la zona minera más antigua e importante del Ecuador desde su época precolombina hasta la actualidad. Se recolectaron datos que muestran las concentraciones de algunos metales pesados no esenciales (Hg, Pb, As, Mg, Zn, Cd), en los cantones Zaruma y Portovelo de la provincia de El Oro. Los resultados revelaron que los recorridos de los lugares afectados por estos metales van desde el nacimiento de los ríos Calera, Amarillo y Pindo, a lo largo de la cuenca, hasta llegar al río Puyango, donde se obtiene los valores más bajos de estos elementos, a excepción del Manganese puesto a que su nivel vuelve a elevarse debido a la presencia mineralógica del bosque petrificado de Puyango. Los datos tomados del FONSAD fueron obtenidos del material procesado de los relaves de molienda y colas de cianuración en el año 2004, los mismos demostraron que las concentraciones de plomo y arsénico superaban los valores límites de referencia para estos metales en los suelos. En otros estudios realizados a los pobladores, se tomaron muestras biológicas (sangre, orina y cabello), y con ello se logró determinar que la mayoría de los habitantes de las poblaciones cercanas a la cuenca del río Puyango, se encuentran envenenados con Hg y Pb en pequeñas cantidades dentro de su organismo. **Palabras clave:** Hongos micorrizico arbusculares (HMA), Nematodos, Granadilla

Palabras clave: salud, minería artesanal, amalgamación, metales pesados, contaminación

ABSTRACT

In this work was made a compilation of the oldest and most important mining zone of Ecuador, from its pre-Columbian times until the present time. Data were collected that show concentrations of some non-essential heavy metals (Hg, Pb, As, Mg, Zn, Cd) in Zaruma and Portovelo cantons of the El Oro's province. The results revealed that the route of the affected sites is from the beginning of the Calera, Amarillo and Pindo rivers along the basin until arriving the Puyango river, where the lowest values of these elements are obtained, except for Manganese because its level rises again due to the mineralogical presence of the Petrified Forest of Puyango. The data taken from the FONSAD were obtained by the material processed from grinding tailings and cyanidation tails in 2004, which showed that the lead and arsenic concentrations exceeded the limits values of reference for these metals in soils. In other studies, made to the settlers, biological samples (blood, urine and hair) were taken, and it allowed to determine the majority habitants of the population near the Puyango basin river are poisoned with Hg and Pb in small amounts.

Key words: Health, artisanal mining, amalgamation, heavy metals, pollution

Introducción

En Ecuador, el incremento de la minería artesanal e ilegal, ha provocado un aumento de la contaminación por metales pesados en la provincia de El Oro, siendo a su vez causante de graves daños en los sectores cercanos a ríos o efluentes. La minería artesanal se consolida en la parte más alta de la cuenca del río Puyango (Zaruma y Portovelo). La extracción del oro (Au) y la plata (Ag) se realiza por fases, la primera fase extrae el mineral en bruto de las minas, y en la segunda, los minerales son tratados en plantas de procesamiento.

Las plantas de procesamiento están ubicadas en la orilla de los ríos Calera y Amarillo. En ellas se llevan a cabo los procesos para el enriquecimiento del mineral, desde la reducción del mineral en bruto mediante molinos, hasta la fase de lixiviación. El cianuro (CN⁻) es utilizado en las piscinas de lixiviación durante el proceso de extracción, los desechos resultantes forman relaves que son eliminados a los ríos y estos se encuentran cargados de metales pesados causando graves impactos ambientales debido a su toxicidad.

Las concentraciones de metales pesados en los suelos, producto de la cianuración y los relaves de amalgamación, tienen niveles que superan los límites establecidos según la normativa

ecuatoriana. Los estudios realizados por el FONSAD en los relaves de Vivanco (Zaruma) y Chancha Geráis (Portovelo), muestran concentraciones de niveles de plomo (Pb) (1796.8-4060.0 mg/Kg), arsénico (As) (396.0-8800.0 mg/Kg), zinc (Zn) (513.0-2670.0 mg/Kg), cadmio (Cd) (27.0-44.1 mg/Kg), y mercurio (Hg) (1.0-35.9 mg/Kg), que rebasan el máximo permisible señalado en la norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados¹. El material particulado en suspensión (MPS) que es concurrente en el Pindo, río donde convergen los ríos Calera y Amarillo, es generado por los desechos mineros (colas y relaves). En invierno el MPS afecta a las poblaciones ubicadas en la cuenca baja del río Pindo-Puyango, debido al arrastre ocasionado por el aumento del caudal².

La presente revisión recopila información de la zona minera más antigua del Ecuador, y a su vez del efecto de la actividad minera desarrollada en esta zona, la misma que ha contribuido a la contaminación del agua, suelo y aire en los cantones Zaruma y Portovelo de la provincia de El Oro, causando graves repercusiones en la salud de los pobladores.

¹ Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias de la Vida, FCV, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, CIBE, Campus Gustavo Galindo Km. 30.5 Vía Perimetral,

Panorama histórico

La explotación minera en el Ecuador tuvo tres escenarios: la época precolombina, la época colonial y la época republicana³. Se conoce poco de la tecnología usada para la extracción de Au y Ag en la época precolombina.

La llegada de los españoles a la actual Provincia del Oro, reconocida por su riqueza aurífera, dio lugar a la fundación del asiento minero de Zaruma, por el capitán Alonso de Mercadillo en 1549⁴. En los inicios de la colonia, las minas más importantes de Zaruma se encontraban situadas alrededor del cerro del Calvario, siendo las más destacadas: El Sesmo, Pillacela, Miranda, Viscaya, Palacios. En la zona de Portovelo, se promovió la explotación del oro de las arenas del río Amarillo y de otras minas de importancia como: Portovelo, Cantambria y Abundancia.⁵

El apogeo de la extracción de minerales por parte de los españoles duró hasta finales del siglo XVI. La escasez de mano de obra por la disminución de los aborígenes y la reducción de las minas de poca profundidad dio lugar a su decaimiento. En la actualidad quedan muy pocos vestigios de las minas que fueron explotadas durante esa época, muchas de ellas fueron abandonadas y otras se derrumbaron y/o taponaron⁶.

En la época republicana, una de las primeras empresas en instalarse en la provincia de El Oro y explotar sus yacimientos minerales fue la Great Zaruma Gold Mining Company Co. La explotación era dificultosa por el relieve de la zona, impidiendo el transporte de maquinarias pesadas desde el puerto de Guayaquil⁷. En 1897, la Great Zaruma es vendida a SADCO, ésta emprendió la explotación de oro a nivel industrial, y llegó a producir más de 99 millones de gramos de oro y 450 millones de gramos de plata, hasta su salida del país en 1950⁸.

Tiempo después de la salida de SADCO, los ex-trabajadores se unen al Estado ecuatoriano para crear la Compañía Industrial Minera Asociada (CIMA), que administró los depósitos hasta 1978, año en que la empresa finalizó sus operaciones⁹. A raíz de este hecho, en 1980 surgió la minería artesanal con los antiguos trabajadores de dicha compañía, ellos organizaron varias cooperativas en base a relaciones de confianza mutua⁹. La técnica que se usaba era la extracción de oro por amalgamación con mercurio. Sin embargo, el fortalecimiento de la minería artesanal en los 90, atrajo nuevas formas de organización de tipo industrial y cambios en su enmarcamiento legal. El avance tecnológico más importante para este grupo, se dio al recuperar el mineral por procesos de cianuración. Esto permitió mayores beneficios para el sector, y se redujo la emisión de residuos y desechos contaminantes¹⁰.

En el año 2007, se instituyó la Empresa Nacional Minera (ENAMI) con la idea de emplear un cambio en la matriz energética. La creación de esta empresa fue con la finalidad de hacer del Ecuador un país de minería a gran escala¹¹. Para ello se promulgaron leyes y reglamentos que aseguraran la continuidad de mega proyectos, y esto a su vez llevó a la ejecución de diferentes tipos de acciones. Las acciones más destacadas fueron el censo de numerosas explotaciones mineras y el plan de regularización de la minería artesanal a nivel nacional (PREMAN), el cual exigía la elaboración de un plan de manejo ambiental para la utilización del agua, y la obtención de concesiones por parte de la Secretaría Nacional del Agua (SENAGUA). Este tipo de operaciones implicaron la regularización del sector, además de la intervención combinada de las autoridades nacionales y locales que obstaculizarían la actividad minera ilegal¹².

Área de explotación

El área de estudio, cubre diferentes ciudades de la provincia de El Oro en donde se desarrolla actividades ganaderas, agrícolas, acuícolas y mineras. Las zonas afectadas abarcan desde el este, en las estribaciones occidentales de la cordillera montañosa andina y parte alta de El Oro (Zaruma, Portovelo), hasta terminar en la unión del río Puyango con la Quebrada Cazaderos, límite internacional con el Perú. En la (Fig. 1) se observa un mapa de las zonas mineras del Ecuador y las áreas de explotación.

Tecnologías utilizadas desde la época precolombina hasta la época colonial

En la época precolombina se explotaba el oro en minas de poca profundidad y en las arenas de los ríos Pindo-Puyango, se desconoce con exactitud cuáles eran las tecnologías aplicadas en esta época.

En la época colonial, la tecnología para la perforación y explotación del cuarzo aurífero era manual. Utilizaban herramientas tales como: la cuña, el combo, el pico, la barreta, la pala y la carretilla, ocasionando un bajo rendimiento. Las piedras eran chancadas a tamaños manejables de unos 5 cm de espesor, seguido a esto pasaban por un molino hidráulico donde eran trituradas, la cantidad de oro recuperado después de este proceso era muy bajo.

A partir de siglo XVII, el mercurio, denominado azogue, fue empleado para optimizar la recuperación del oro. Consecuente a la salida del molino hidráulico, se instalaban 3 canaletas inclinadas de hormigón de unos 8 metros de longitud, 40 cm de ancho y 30 cm de alto, en éstas se colocaban las bayetas para que circulara la arena aurífera mezclada con agua, de manera que las bayetas absorbieran la arena por sedimentación¹³. Las bayetas eran exprimidas en cajones de hormigón, donde drenaban el agua y la arena se solidificaba. Al finalizar, la arena pasaba a los depósitos especiales y era mezclada con azogue, permitiendo atrapar el oro en forma de perlas, una vez evaporado el azogue quedaba el oro en polvo. El Oro en polvo resultante del proceso de evaporación, contenía impurezas y trazas de otros metales dándole un valor no mayor a 18 quilates.

Tecnologías utilizadas al inicio de la época republicana y en el nacimiento de la minería artesanal.

En la época republicana, la tecnología aplicada por SADCO para la explotación de vetas auríferas, era muy similar a la aplicada por CIMA, empresas Mineras y asociaciones. La principal diferencia era el molino chileno, empleado e introducido por las asociaciones¹³.

La extracción de minerales en las vetas auríferas se subdividió en: la explotación del cuarzo, la trituración del cuarzo y la extracción de minerales en las plantas de tratamiento. El acceso a las vetas auríferas incrustadas en la tierra, se realizaba desde la superficie, mediante frontones. El uso de explosivos era muy utilizado en la producción de cuarzo, como nitrato de amonio o cartuchos de dinamita; la sección de perforaciones era de 120 cm de ancho por 180 cm de alto, con pendientes longitudinales mayores o iguales al 2%, esto permitía llevar el agua infiltrada a los sitios de bombeo, por gravedad. En las plantas de tratamiento se obtenía oro y plata en barra, al reducir el cuarzo a $\frac{3}{4}$ " de espesor, utilizando 40 pisones metálicos hidráulicos.

El nacimiento de la minería artesanal comenzó en los años 80, impulsado por los niveles elevados de pobreza y de desempleo



Fig. 1. Áreas de explotación de la provincia del Oro ubicadas en los cantones Zaruma y Portovelo. Fuente. Fundación Salud Ambiente y Desarrollo²

¹⁴. La explotación y extracción de oro por parte de la minería informal es realizada por métodos convencionales, donde se aprovecha el peso específico del oro y separa a los sedimentos pesados por concentración gravimétrica.

El proceso de amalgamación permite la separación y recuperación del oro unido al mercurio. Los mineros artesanales menos

desarrollados, realizan el proceso de separación en forma manual, y los más perfeccionados utilizan placas de amalgamación, tromeles, y cribas. La separación de oro del mercurio es realizada al aire libre mediante el proceso de destilación por calor.

La explotación de yacimientos primarios con perforadoras a gasolina mejoró el avance de las excavaciones a partir de los años 80. En la misma época, con la utilización de compresores de ventilación y martillos neumáticos se llegó a mayor profundidad en los frentes de trabajo subterráneos, también ingresaron los llamados molinos chilenos que eran más eficientes comparándolos con los molinos californianos, luego se introdujo los molinos de bola para incrementar la capacidad de procesamiento.

A partir de los años 90, la extracción minera mejoró al incorporar carros y vagones eléctricos, a finales de esta época, iniciaron los procesos de cianuración, mejorando en forma significativa la recuperación de oro. En la actualidad estos procesos siguen activos¹⁵

Afectaciones por la actividad minera

Resultados y Discusión

La extracción de metales preciosos, requiere del empleo de productos químicos y de grandes cantidades de agua en los pozos de extracción, dentro de estos pozos existen sustancias ligadas al tipo de suelo o mina que se combinan con los productos químicos, generando una gran cantidad de desechos tóxicos.

Los desechos tóxicos, subproducto de procesos mineros de relaves y escombros, constan de azufre, cadmio, plomo,

Metales Pesados	NCAS mg/Kg	Colas de cianuración mg/Kg	Relaves de amalgamación mg/Kg
As	15,00	396,00	8800,00
Cd	10,00	40,11	27,40
Mn	-----	1258,00	281,00
Zn	380,00	513,00	2670,00
Pb	150,00	1796,88	4060,00
Hg	10,00	1,00	35,90

Tabla 1. Concentraciones de metales pesados en colas de cianuración y relaves de amalgamación excediendo las concentraciones permisibles según la NCAS²

arsénico, molibdeno, cianuro libre y compuestos fenólicos¹⁶. La contaminación del suelo se da cuando este tipo de desechos se incorporan al ambiente sin ser tratados en forma adecuada.

En la tabla 1 muestra el promedio de las concentraciones de metales pesados permisible en suelo, según la Norma de Calidad Ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados (NCAS), establecida en el Ecuador. Asimismo, se evidencia las concentraciones de metales pesados encontrados en las colas de cianuración y relaves de amalgamación de los cantones Portovelo y Zaruma en un estudio realizado en el 2004.

Los principales problemas de acidificación en la provincia de El Oro, se dan en los ríos y en las aguas subterráneas, debido a: los drenajes de cunetas, corredores subterráneos, relaves, escorias, disolución oxidativa y lixiviación de sulfuros metálicos, en especial pirita. Los ríos que presentan mayor grado de contaminación son el río Pindo y Puyango. El estudio realizado por el Ministerio del Ambiente del Ecuador (MAE), determinó que en verano la posibilidad de ingreso de metales pesados en solidos suspendidos al organismo humano y peces, es más mayor que en invierno. Un claro ejemplo se da en Puyango viejo, donde las concentraciones de Pb en verano van entre 3972 y 5080 ug/g, y en época lluviosa el Pb disminuye a 269 y 345 ug/g. También se ha encontrado Pb en agua filtrada, donde el contenido del plomo es más alto en el río Calera debido a la mayor actividad minera de este sector (5.5 µg/L). Así mismo, a medida que el agua baja por la cuenca, se ve un notable incremento de este mineral (32.7 µg/L). Otro estudio realizado, por el (MAE) en el año 2006, en la parte alta de la cuenca del río Puyango, parroquia Malvas del cantón Zaruma, encontró plomo en plantaciones de café a una concentración de 8,7 ug/g¹⁷. Resultando similar al estudio realizado por Tarras-Wahlberg en las parroquias Arcapamba y Malvas, donde se evidencio Pb bioacumulado (0.12 y 0.78 ug/g), también se encontraron valores altos de Pb en especies de larvas bénticas de insecto megalóptero (entre 100 y 800 ug/g), y en el mismo estudio se halló dentro del río Amarillo, al pez Life (*Trichomycterus punctulatus*) con una concentración de Pb de (20 ug/g)¹⁸.

En los cantones de Zaruma y Portovelo se llevó a cabo un estudio similar al de Tarras, que afirmó la contaminación con Pb en peces en la parte baja del río Puyango, propiciado por el mal manejo de los residuos. La determinación de plomo evidenció la existencia de altas concentraciones de este elemento en los peces; sábalo (*Brycon atrocaudatus*) (1,3 ug/g) y el pez dorado

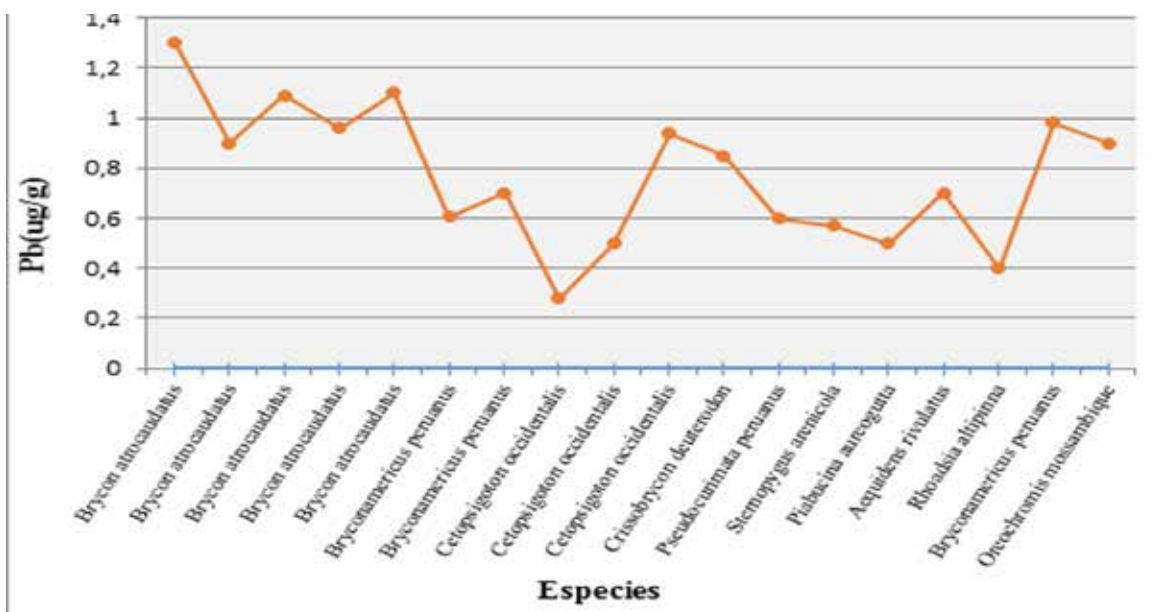


Fig. 2. Concentraciones de plomo en los peces, cuenca del río Puyango, época de verano 2004. Fuente. Fundación Salud Ambiente y Desarrollo²

(*Bryconamericus peruanus*) (1,2 ug/g), en comparación a los peces vieja (*Aequidens rivulatus*) (0,25 ug/g) y los peces ciego (*Cetopsigoton occidentalis*) (0,28 ug/g) quienes tienen menores concentraciones, pero que a su vez sobrepasan los valores recomendados por los organismos internacionales relacionados con la salud humana (0.1 ug/g)¹⁹. En la figura 2 se observa a las principales especies de peces de la zona, con altas concentraciones de plomo.

En los ríos de la provincia de El Oro, las descargas de los contaminantes resultantes de la actividad minera afectan negativamente a toda forma de vida, provocando severos impactos ambientales y estragos en la salud humana. Los cantones de Portovelo y Zaruma son los principales sectores perjudicados debido a la ingesta de agua y alimentos contaminados. Hasta ahora, son muy escasos los estudios respecto a las consecuencias que provoca la actividad minera en la salud humana²⁰. En la Tabla 2 se muestra los niveles de concentración máxima admisible (CMA), y sus consecuencias en la salud, causada por las trazas excedentes de metales pesados según lo registra la agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA)^{21,22} y por la legislación ecuatoriana²³.

Las poblaciones aledañas de los cantones Balsas, Marcabellí, y Las Caías, ubicados en la cuenca media y baja del río Pindo-Puyango,

Metales	USEPA, (CMA)	Ecuador, (CMA)	Consecuencias en la Salud Humana
Pesados	mg/L	mg/L	
As	0.05	0.05	Manifestaciones cutáneas, cánceres viscerales, enfermedad vascular.
Cd	0.01	0.01	Daño renal, trastorno renal y efectos carcinógenos.
Mn	0.20	1.00	Daños en el tracto respiratorio y en el cerebro, alucinaciones, olvidos y daños en los nervios.
Zn	0.80	5.00	Depresión, letargo, signos neurológicos y aumento de la sed.
Pb	0.006	0.05	Teratogenicidad cerebral, enfermedades renales, vasculares y neuronales.
Hg	0.00003	0.001	Artritis reumatoide y enfermedades renales, vasculares y neuronales.

Tabla 2. Consecuencias en la salud humana al sobrepasarse los límites de concentración máxima admisible (CMA), de metales pesados en agua para consumo humano.

muestran valores constantes de Hg, Pb y Mn en suelos y agua, evidenciando la exposición continua de estos contaminantes entre los pobladores.

Durante los últimos años, se han realizado investigaciones en América para determinar la presencia de alteraciones subclínicas del sistema nervioso, las mismas que son generadas por la continua exposición de contaminantes neurotóxicos. En exámenes médicos ordinarios pasan desapercibidas, solo pueden ser detectadas por baterías de alta sensibilidad.²⁴

El impacto de Hg en la salud humana fue diagnosticado al realizar pruebas de intoxicación por este metal a 200 pobladores,

en su mayoría mineros propios del sitio. Los resultados que arrojaron los exámenes fueron alarmantes, debido a que el 52% de individuos en Portovelo dieron positivo en manifestaciones de intoxicación por Hg, al igual que el 57% de individuos en Zaruma.²⁵ Otros estudios realizados a 229 personas en Portovelo (100), Puyando Viejo (69) y Gramadal (60), arrojaron resultados donde muestran niveles máximos de plomo en sangre y de mercurio en orina y sangre. Los niveles de Hg y Pb por encima de los valores referentes²⁶, son evidenciados en la Tabla 3.

En la provincia del Oro, en los cantones Zaruma y Portovelo, se identificaron áreas críticas de contaminación por metales

INDICADOR BIOLÓGICO	N	Mínimo	Máximo	Media	DS	Referente
Plomo en sangre (ug/L)	225	0	1150	230	220	800
Mercurio en orina (ug/L)	225	0	97	12	14	50
Metil mercurio en pelo (ug/g)	126	0	6.09	1.17	0.9	1
Mercurio en sangre (ug/L)	90	-1.08	32.49	5.09	5.1	20

Tabla 3. Indicadores biológicos, de contaminantes de metales pesados en la población de la cuenca del Puyango 2001, comparado a los niveles referentes según el Instituto Nacional de Medicina y Seguridad del Trabajo de la unión europea.

Conclusiones

pesados en poblaciones expuestas a la contaminación minera. Las empresas mineras han actuado sin responsabilidad social y han dejado de lado la seguridad y la salud de las personas expuestas a estos contaminantes.

El plomo encontrado en los pescados presenta una de las mayores preocupaciones en cuanto a salud se refiere. Los mismos que presentan concentraciones de 0.4 a 1.3 ug/g de peso fresco, y si los límites de ingestión diaria son del orden de 30 ug, ese límite sería alcanzado con el consumo diario de apenas 30 a 60 gramos de pescado. Además, existen otras vías de exposición de la población al Pb, como el consumo directo de agua del río en las comunidades de Gramadal-Las Vegas, el consumo de productos agrícola, como por ejemplo el café que presenta concentraciones de 8,7 ug/g.

Referencias bibliográficas

- MAE., Ministerio del Ambiente del Ecuador Recurso Suelo, Libro VI Anexo 2, Norma de la Calidad Ambiental del Recurso Suelo y Criterios de Remediación para suelos contaminados, 31 pp., 2002. <https://maeorellana.files.wordpress.com/2015/11/anexo-2-suelo.pdf>
- FUNSAID, Impactos en el ambiente y la salud por la minería del oro a pequeña escala en el Ecuador (segunda fase), Fundación Salud Ambiente y Desarrollo, Informe Técnico Final, Quito, Ecuador, 90 pp., 2007. <http://www.funsad.org/Material/Material/INVESTIGACIONES/PuyangofaseII.pdf>
- A. Acosta, La Maldición de la Abundancia, Quito: Ediciones Abya-Yala, Quito, Ecuador, 239pp, 2009. <https://es.scribd.com/document/32990118/Libro-Alberto-Acosta-Maldicion-Abundancia-2009>
- E. A. Reyes, «Porpueta Universitaria,» 14 12 2014. [En línea]. Available: <http://docenteconvoz.blogspot.com/2014/12/zaruma-balcon-de-los-andes.html>.
- C. Astudillo y J. Mora, El Oro. Nueva Visión Histórica, Machala: Machala Universidad Técnica, Facultad de Ciencias Sociales, 2003. <http://www.worldcat.org/title/oro-nueva-vision-historica/oclc/948237300>
- T. L. R. Bustamante, El Dorado o la caja de Pandora: matices para pensar la minería en Ecuador. FLACSO, Quito, Ecuador, 145pp, 2010. <http://www.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/43823.pdf>
- J. S. B. J. M. Tweedy, Dirección, "Quebradas de oro" (original en inglés, "Streams of gold"). [Película]. 2004. <https://www.youtube.com/watch?v=Kn4ImwX9fcE>
- V. I. Vivas, «Minería Gran Escala en la Cordillera del Cóndor, Maestría en Estudios Latinoamericanos con Mención en Políticas Culturales, Universidad Andina Simon Bolívar,» Universidad Andina Simón Bolívar Sede Ecuador, Quito, Ecuador, 144 pp, 2011. <http://biblioteca.clacso.edu.ar/clacso/engov/20130829123046/VIVASLosDilemas.pdf>

9. F. Sandoval, «La Pequeña Minería en el Ecuador.» Mining, Minerals, and Sustainable Development (MMSD), World Bank, IIED, World Business Council for Sustainable Development, número 75, Octubre de 2001. <http://pubs.iied.org/pdfs/G00721.pdf>

10. P. Pablo, C. Héctor, P. Alejandro, S. William, O. L. Joao, D. Estefanía y M. Pía, La economía del oro, Ensayos sobre la explotación en Sudamérica, La Paz, mayo de 2015, viii; 186 pp: Centro de Estudios para el Desarrollo Laboral y Agrario – CEDLA, 2015. https://www.cedla.org/sites/default/files/libro_oro_regional_2015.pdf

11. D. J., M. J. V. T. Denvir, «In Ecuador, mass mobilizations against mining confront President Correa», Upside Down World, 19 de noviembre de 2008. upside-downworld.org/main/content/view/full/1588/49., 2008.

12. Nuestra Seguridad, «La tragedia de la minería ilegal en Ecuador.» Revista Digital del Ministerio de Seguridad, p. 12 pp., 2013. <http://www.nuestraseguridad.gob.ec/es/articulo/la-tragedia-de-la-miner%C3%ADa-ilegal-en-ecuador>

13. Mora, Historia de la Explotación Minera de los Cantones Zaruma y Portovelo, Quito, 2008. <https://es.scribd.com/doc/111174997/Historia-y-Actualidad-explotacion-minera-Cantones-Zaruma-y-Portovelo-Provincia-de-El-Oro#scribd>

14. ISAT y CESIP, Niveles de exposición ambiental, ocupacional y estado de salud de los niños de la comunidad minera artesanal de oro. Mollehuaca, Instituto Salud y Trabajo; Centro de Estudios Sociales Investigación y Publicación, Estudio de Salud, Arequipa, 76pp, 2001. http://white.lim.ilo.org/ipecc/documentos/estudio_de_salud_mollehuaca.pdf

15. R. Machala, «Zaruma tiene dos clases de minería.» Diario El Comercio, p. 1, 27 Octubre 2010. <http://www.elcomercio.com/actualidad/ecuador/zaruma-clases-mineria.html>

16. P. López, S. Ainzúa y C. Z. y P. Vasconi, «La minería y su pasivo ambiental». En Análisis de políticas públicas. No. 24., <http://www.navarro.cl/defensa/Royalty/APP24%20relaves.pdf>. (Visitado en septiembre de 2009), 2009.

17. UNEP, «Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP),» 2006. [En línea]. Available: http://www.unep.org/chemicalsandwaste/Portals/9/Lead_Cadmium/docs/submissions/Submit_GOV_ECUADOR.pdf.

18. Tarras-Wahlberg, «Environmental impacts and metal exposure of aquatic ecosystems in rivers contaminated by small scale gold mining: the Puyango river basin, Southern Ecuador. The Science of Total Environment (in press), Cambridge.» 2001. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11669272>

19. WHO, ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA, Geneva, World Health Organization, 188 pp., 1995. <http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/en/>

20. F. Hruschka y C. Salinas, Estudios Colectivos de Impacto Ambiental y Plan de Manejo Ambiental para las Plantas de Beneficio Mineral Aurífero ubicadas en la Vega del Río Calera/Salado, Zaruma: CEN-DA-COSUDE, Projekt Consult, Mimeo, 1996. <http://www.funsad.org/Material/Material/INVESTIGACIONES/PuyangofaseI.pdf>

21. T. Spiro, Química medioambiental, 2da ed. Pearson Educación. España, 504 pp., 2003.

22. T. Nguyen, Applicability of agricultural waste and by-products for adsorptive removal of heavy metals from wastewater. Bioresource Technology. 148, 574-585., 2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24045220>

23. MAE, Ministerio de Ambiente del Ecuador Recurso Agua, Libro VI Anexo 1, Norma de la Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua, 54 pp., 2002. <http://www.industrias.ec/archivos/CIG/file/CARTELERA/Reforma%20Anexo%2028%20feb%202014%20FINAL.pdf>

24. Lebel, Neurotoxic Effects of Low-Level Methylmercury Contamination in the Amazonian Basin. Environmental Research. 79. p: 20-32, 1998. https://unites.uqam.ca/gmf/globalmercuryforum/files/articles/amazon/lebel/lebel_1998.pdf

25. J. Martínez y J. Santos, Salud Ocupacional. Incidencia del Mercurio en la región de Zaruma Y Portovelo, mimeo, PMSC, CEN-DA-COTESU, Zaruma, 1994. http://white.lim.ilo.org/ipecc/documentos/estudio_de_salud_mollehuaca.pdf

26. ISBN, Notas Explicativas de ayuda al diagnóstico de las enfermedades profesionales; Comunidades Europeas; España; pp: 212, 1999. <http://www.uhu.es/servicio.prevencion/menuservicio/info/medicina/notasayudadiagenfprof.pdf>

Recibido: 25 de mayo 2017

Aprobado. 15 septiembre 2017

SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOALS



Revista Bionatura supports the Sustainable Development Goals

RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

Caracterización molecular y conservación de hongos del suelo asociados con la respuesta a estrés por nitrógeno

Molecular characterization and conservation of soil fungi associated with the stress response by nitrogen

Xiomara Recalde Rodríguez¹ Amina Sánchez Rodríguez²

<http://dx.doi.org/10.21931/RB/2017.02.04.6>

RESUMEN

La fijación biológica del Nitrógeno es un proceso que aporta con un 65% de fijación anual de nitrógeno al ecosistema; ejecutada por microorganismos fúngicos capaces de reducir la forma atmosférica del N en una forma asimilable. Existen varias actividades antrópicas que han favorecido el aumento de la adicción de N, lo que ha generado la duplicación de la cantidad que es incorporada por año en los diferentes ciclos biológicos de la tierra. El presente estudio tiene como objetivo caracterizar molecularmente y criopreservar hongos asociados con la respuesta al estrés por N. Se seleccionaron suelos sometidos a un alto estrés por adicción sostenida de N junto a suelos control, de los cuales se aisló los hongos cultivables para ser caracterizados y clasificados morfológicamente a través de técnicas moleculares. Obteniendo como resultado 43 cepas caracterizadas por morfología básica (color, forma y tamaño). Por medio de la secuencia del gen ITS ARN ribosomal, la filogenia indicó la presencia del Phylum Ascomycota con dos clados: Eurotiales con los siguientes géneros (*Penicillium*, *Citrinum*, y *Aspergillus*). El clado Hypocreales presenta los géneros (*Metarrhizium*, *Clonostachys* y *Tolyposcladium*) y el Phylum Zygomycota con el género *Morliarella*. El porcentaje de reactivación de las cepas criopreservadas fue de 98%.

Palabras Clave: Caracterización molecular, hongos cultivables, ITS ARN ribosomal Ascomycota, Zygomycota, criopreservación.

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation is a process that provides a 65% annual nitrogen fixation ecosystem; executed by fungal microorganisms capable of reducing atmospheric form of N in an assimilable form. There are several human activities that have favored increasing addiction of N, which has led to the doubling of the amount of N that is incorporated by year in the different life cycles of the soil. This study aims to characterize molecularly and cryopreserved fungi associated with the stress response of N, soils subjected to high stress addiction sustained N with soil control, which cultivable fungi was isolated to be characterized and classified were selected morphologically through molecular techniques. Which resulted in 43 strains characterized by basic morphology (color, shape and size). By means of the sequence of the ribosomal ITS RNA gene, phylogeny indicated the presence of the phylum Ascomycota two clades. Eurotiales with the following genres (*Penicillium*, *Citrinum*, and *Aspergillus*). The Hypocreales clade presents the genera (*Metarrhizium*, *Clonostachys* and *Tolyposcladium*) and Phylum Zygomycota with the genus *Morliarella*. The reactivation rate of the cryopreserved strains was 98%.

Keywords: Molecular characterization, cultivable fungi, ITS ribosomal RNA, Ascomycota, Zygomycota, cryopreservation.

Introducción

Los bosques montanos tropicales son ecosistemas con un alto grado de diversidad biológica, pero se encuentran altamente amenazados por su vulnerabilidad ante los cambios globales como el cambio climático y mal uso de los suelos⁽¹⁾. Aparte de su gran diversidad biológica, estos ecosistemas favorecen el desarrollo de microorganismos del suelo debido a la gran cantidad de variaciones ambientales⁽²⁾. En las últimas décadas la deposición atmosférica ha aumentado notablemente por fuentes antropogénicas⁽³⁾, debido a la industrialización, el uso de productos químicos y fertilizantes, o a la quema de biomasa⁽⁴⁾. Actualmente los suelos tropicales aportan con el 30% de las emisiones globales de N₂O, que es uno de los principales gases de invernadero⁽⁵⁾. Como resultado se evidencia un alto nivel de N en los suelos tropicales, modificaciones en la biota y aceleración del ciclo de descomposición y fijación de N en estos ecosistemas⁽⁵⁾.

La adición de N afecta todos los procesos en el suelo, especialmente a los procesos biológicos⁽⁶⁾, dichos procesos son desarrollados por microorganismos (bacterias y hongos) que se encuentran asociados al suelo⁽⁷⁾. Sus funciones en el ecosistema son de vital importancia para procesos bioquímicos y procesos de degradación⁽⁸⁾. Dentro de las comunidades microbianas, las comunidades fúngicas son de gran interés, porque funcionan como un indicador de salud en un ecosistema. Una gran diversidad de hongos indica la capacidad de los ecosistemas para recuperarse ante daños ambientales (p.ej. adición excesiva de N); además, las comunidades fúngicas juegan un papel importante en la degradación de la materia orgánica y en el ciclo natural del N⁽⁷⁾. Por ello representan la mayor parte de la biomasa microbiana en los suelos⁽⁹⁾.

¹Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador

²MS2E Microbial Systems Ecology and Evolution / Ecología y Evolución de Sistemas Microbianos. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador.

Autor de correspondencia: Xiomara Recalde Rodríguez xiomysr14@hotmail.com

Tabla 1: Caracterización morfológica de hongos cultivables del suelo

Bloque	Estrés	Número de muestra	Color	Forma de la colonia	Tamaño de la colonia
1	Control	1	BLANCO	CIRCULAR	8.5
		2	ROSA	CIRCULAR	5.5
		3	ROSA-AMARELLO	CIRCULAR	3.5
		4	CAFÉ-ROSA	ALARGADO	7.4
		5	ROSA	CIRCULAR	7.3
		6	ROSA	CIRCULAR	8.5
		7	ROSA PASTEL	CIRCULAR	0.5
1	Nitrógeno	8	ROSA PASTEL	CIRCULAR	5.2
		9	NEGRO	CIRCULAR	3.8
		10	NEGRO	CIRCULAR	4
		11	VERDE-ROSA	ALARGADO	6.7
		12	FUCSIA	CIRCULAR	3.9
		13	VERDE-AMARILLO	ALARGADO	7.1
		14	ROSA	CIRCULAR	6.5
		16	BLANCO	CIRCULAR	8.5
		17	VERDE	CIRCULAR	5
		18	ROSA	CIRCULAR	4.5
		2	Control	19	VERDE CLARO
20	BLANCO			ALARGADO	8.5
21	VERDE-AMARILLO			ALARGADO	6
22	ROSA PASTEL			CIRCULAR	4.3
23	AMARILLO-VERDE			CIRCULAR	4.1
24	ROSA PASTEL			CIRCULAR	6.8
25	ROSA PASTEL			CIRCULAR	7
26	ROSA PASTEL			CIRCULAR	5
27	ROSA			CIRCULAR	6
28	ROSA			CIRCULAR	4.8
29	CREMA			CIRCULAR	8
2	Nitrógeno	30	ROSA	CIRCULAR	5
		31	ROJO	CIRCULAR	7.3
		32	VERDE-ROSA	CIRCULAR	6.7

El objetivo de este estudio es caracterizar la morfología básica y molecular de la diversidad de hongos de un suelo de bosque montano tropical en el sur del Ecuador. Los bosques montanos de esta región representan el 11% de los bosques montanos tropicales del mundo⁽⁵⁾, pero sus suelos son altamente afectados por la adición excesiva de N. Además, el presente trabajo analiza el impacto potencial asociado a la adición sostenida de N y la conservación de los hongos aislados mediante el método de criopreservación.

Materiales y Métodos

Área de estudio

El muestreo se realizó en la Reserva Biológica San Francisco (RBSF), ubicada a 30 km de la ciudad de Loja, en la provincia

Tabla 2: Reactivación de Muestras Criopreservadas

Bloque	Estrés	Número de Muestra	Reactivación		
1	Control	1	Positiva		
		2	Positiva		
		3	Positiva		
		4	Positiva		
		5	Positiva		
		6	Positiva		
		7	Positiva		
1	Nitrógeno	8	Positiva		
		9	Positiva		
		10	Positiva		
		11	Positiva		
		12	Positiva		
		13	Positiva		
		14	Negativo		
		16	Positiva		
		17	Positiva		
		2	Control	18	Positiva
				19	Positiva
20	Positiva				
21	Positiva				
22	Positiva				
23	Positiva				
24	Positiva				
25	Positiva				
26	Positiva				
27	Positiva				
28	Positiva				
2	Nitrógeno	29	Positiva		
		30	Negativo		
		31	Positiva		
		32	Positiva		

de Zamora Chinchipe dentro del Parque Nacional Podocarpus⁽¹⁰⁾. El muestreo de campo se realizó en el sector T1 específicamente en el transecto preestablecido NUMEX⁽¹¹⁾. El transecto NUMEX presenta diferentes niveles de adición de minerales, del cual se seleccionó el bloque 1 y 2. Cada bloque contiene dos parcelas la primera con suelos control (suelos sin tratamiento de adición de N) y la segunda con adición de N sostenido por nueve años consecutivos. Dando como resultado 4 parcelas muestreadas por los dos bloques seleccionados.

Toma de muestras y aislamiento *in vitro*.

De cada parcela se extrajo cinco muestras de suelo a una profundidad de 30 cm. Las muestras de suelo se preservaron a -20°C. El aislamiento de los hongos se hizo por el método de diluciones seriadas a partir de suelo de muestra homogenizado. Y se procedió a cultivarlas en cajas Petri con medio de cultivo Rosa Bengala.

Tabla 3: Cuadro de asignación de género mediante búsqueda por homología (BLAST) a cada uno de los aislados puros. Se detalla además el origen de cada aislado (bloques y tratamientos).

Código	Especie	Bloque			
		1		2	
		Suelo con Nitrógeno	Suelo Control	Suelo con Nitrógeno	Suelo Control
B1N3_3	<i>Aspergillus</i> sp.	+			
B2C3_2	<i>Aspergillus</i> cf. <i>Niger</i>				+
B2N4_2	<i>Aspergillus</i> cf. <i>Niger</i>			+	
B2C3_2	<i>Aspergillus</i> cf. <i>Niger</i>				+
B2C3_1-2	<i>Clonostachys</i> sp.				+
B2N3_3-4	<i>Metarhizium</i> sp.			+	
B2N3_3-7	<i>Metarhizium</i> sp.			+	
B2N3_3-6	<i>Metarhizium</i> sp.			+	
B2N3_1	<i>Metarhizium</i> sp.			+	
B1N3_2-2	<i>Metarhizium</i> sp.	+			
B1C3_3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>		+		
B1C3_2-2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>		+		
B1C4_3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>		+		
B1C5_1	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>		+		
B1C3_1-3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>		+		
B1C3_1-4	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>		+		
B1N4_1-3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>	+			
B1N5_1-2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>	+			
B1N3_2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>	+			
B1N3_1-3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>	+			
B1N3_1-2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>	+			
B2C5_1-2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>				+
B2C3_1-3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>				+
B2C5_1-1	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>				+
B2C5_3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>				+
B2C4_1	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>				+
B2C3_1-3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>				+
B2C5_1	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>				+
B2N3_3-5	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>			+	
B2N3_3-3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>			+	
B2N4_1	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>			+	
B2N4_1-2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>			+	
B2N4_1-2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>			+	
B2N3_3-2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>			+	
B1N4_1-3	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>	+			
B1N3_1-2	<i>Penicillium</i> cf. <i>Citrinum</i>	+			
B1N3_2-1	<i>Tolyocladium</i> sp.	+			
B2N3_3	<i>Tolyocladium</i> sp.			+	
B2C3_1	<i>Zygomycota</i>				+

El conteo de colonias se realizó cada 2 días para obtener las unidades formadoras de colonia. Finalmente se realizó el conteo de las colonias fúngicas tomando en consideración la morfología básica de las colonias como: el color, tamaño, y la forma de crecimiento de la colonia.

Criopreservación de hongos

El proceso de criopreservación se realizó en una relación 70:30 de Potato Dextrose Agar (PDA) y glicerina, criopreservados a una T° de -4°C. Posteriormente fueron reactivados para medir la viabilidad de las cepas.

Caracterización molecular

Se extrajo el ADN de las muestras de hongos por medio del kit de extracción UltraClean Microbial DNA Insolation Kit MoBio, el mismo que nos permitió obtener ADN genómico con alta calidad⁽³⁰⁾. Se cuantificó la calidad del ADN empleando el NanoDrop 2000 - Thermo Scientific.

Reacción en Cadena de la Polimerasa - PCR.

Las PCR se realizaron con ayuda del termociclador (Pro Flex), las

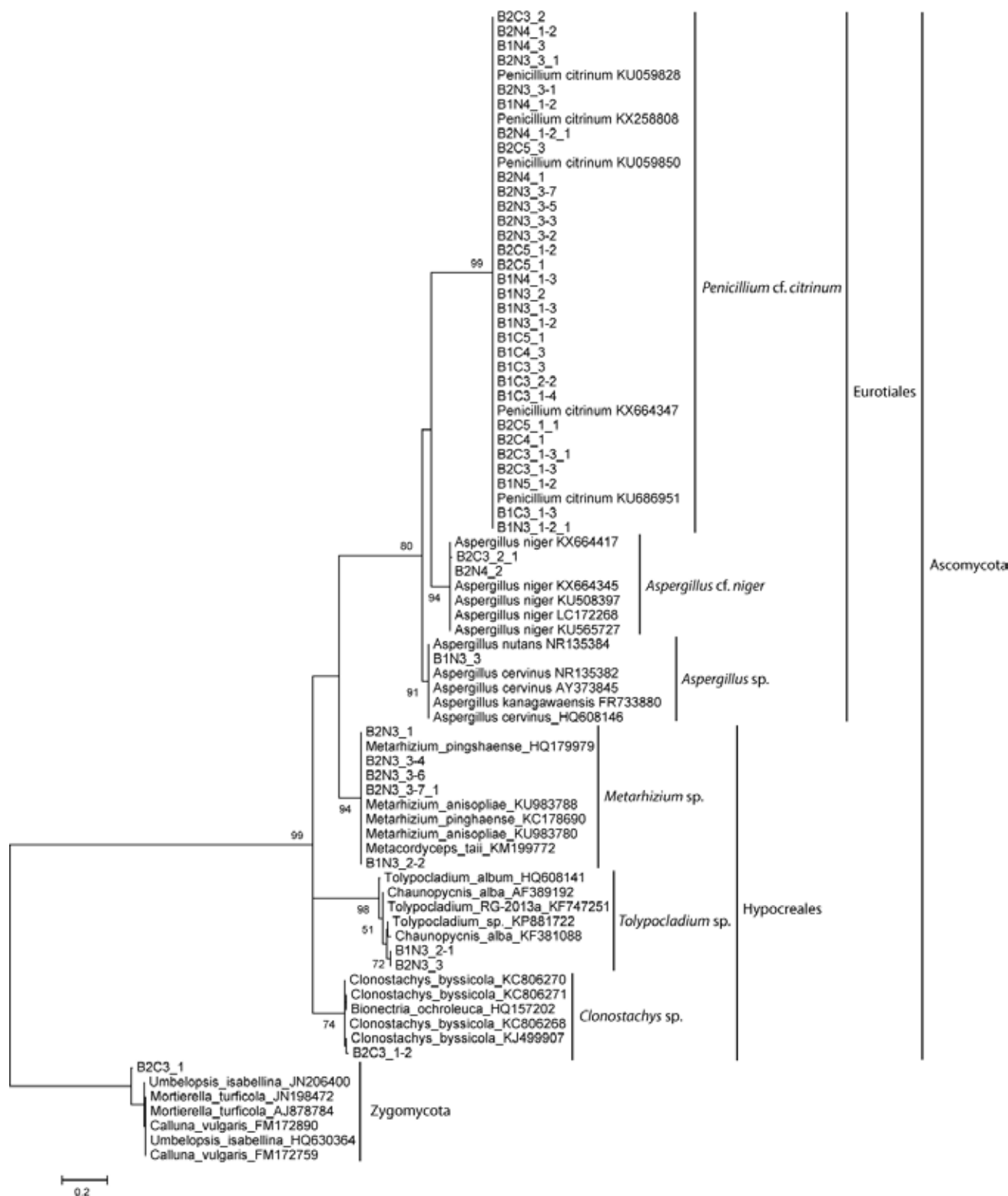


Figura 1: Árbol filogenético de la región ITS 1 obtenida de los aislados. El árbol presenta los géneros que se obtuvieron de la RBSF; fue soportado con secuencias obtenidas del GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

condiciones aplicadas fueron: 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 primers utilizados poseen las siguientes secuencias: ITS 1f: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA⁽¹²⁾, ITS 5.8S: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG⁽¹³⁾.

Finalmente se procedió a la verificación de los productos de PCR por medio de la electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Análisis de datos.

Las muestras fueron secuenciadas en la compañía MACROGEN (Korea). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias del GenBank, por medio de la utilización de la herramienta BLASTn; las secuencias homólogas seleccionadas de este programa nos sirvieron para brindar soporte a los resultados obtenidos. Esto permitió asignar un género a cada una de las secuencias, tomando en cuenta el mejor hit. Con la ayuda del programa MEGA6 y de un análisis Maximum Likelihood, se obtuvo el árbol filogenético de las secuencias analizadas.

Resultados y Discusión

Caracterización Morfológica básica de los hongos cultivables del suelo.

De los resultados del aislamiento y posterior identificación de los aislados puros, se logró obtener un total de 43 aislados de ambos bloques que representan a los hongos cultivables del suelo Tabla 1.

Con la metodología aplicada no fue posible obtener un 100% de aislados del suelo; existen varias razones para justificar este hecho. Principalmente se toma en cuenta la distribución, debido a que estos no se encuentran distribuidos de manera uniforme en el suelo⁽¹⁴⁾. La selección del medio es un factor muy importante al momento de incrementar el porcentaje obtenido de hongos cultivables del suelo, debido a que los nutrientes que contiene el medio favorecen el crecimiento del material fúngico. Cabe recalcar que la presencia del Clorofenicol en el medio Rosa Bengala asegura que no exista crecimiento de bacterias en los cultivos⁽³¹⁾. A pesar de las limitaciones que la metodología presenta, los resultados obtenidos generan un aporte de conocimiento científico sobre la composición fúngica de los suelos con adición de N.

Criopreservación

La utilización de la combinación del medio PDA más la adición de glicerina en una relación 70:30 respectivamente, permitió obtener el resultado deseado en la criopreservación de los aislados. De los 43 morfotipos aislados e identificados se realizó la criopreservación, con un 98% de éxito en la reactivación de material Tabla 2. Se sabe que los tiempos de conservación de material fúngico en criopreservación son críticos para la supervivencia celular⁽¹⁵⁾. Se ha comprobado que el mejor crioprotectante para la criopreservación de hongos es la glicerina⁽¹⁶⁾. Debido a que previene la acumulación de agua y la formación de cristales que pueden romper la membrana celular, gracias a su bajo peso molecular⁽¹⁵⁾.

Análisis Filogenético

El material genético proporcionado por las 43 muestras aisladas fue obtenido a partir de la secuenciación de la región ITS 1, de acuerdo a los resultados obtenidos podemos identificar la presencia de dos Phylum: Ascomycota y Zygomycota, dentro del Phylum Ascomycota se encuentran dos clados, Eurotiales y Hypocreales; dentro de Eurotiales se obtuvo los siguientes géneros *Penicillium*, *Citrinum*, y *Aspergillus*. El clado Hypocreales presenta los géneros *Metarrhizium*, *Clonostachys* y *Tolyposcladium*. En el filum Zygomycota se obtuvo el género *Morlierella* (Tabla 3). En la figura 1 se muestra el árbol filogenético, obtenido con el método maximum likelihood, en el que se incluyen las 43 secuencias pertenecientes a los aislados puros obtenidos en este estudio.

Los géneros *Penicillium*, *Citrinum* y *Aspergillus* son capaces de adaptarse a la variación de disponibilidad de nutrientes⁽¹⁷⁾. Existen varios estudios realizados en donde se ha encontrado que estos géneros pueden desarrollarse en suelos que han sido sometidos a diferentes tipos de estrés, en nuestro caso la adición sostenida de N⁽¹⁸⁾.

La presencia de *Penicillium* cf. *Citrinum* tanto en las parcelas con N como en las parcelas control se debe a que esta especie es capaz de crecer en medios que se encuentran alterados, como se ha demostrado en el estudio publicado por⁽²⁰⁾. De la misma manera el género *Aspergillus* es versátil al momento de adaptar su metabolismo para utilizar una amplia cantidad de N en los suelos⁽²¹⁾.

Los géneros *Metarrhizium* y *Tolyposcladium* fueron hallados en ambos bloques, pero solo en suelos con adición de N. Las especies de estos géneros actúan como entomopatógenos (parásitos de insectos), endófitos y saprofitos, además pueden llegar a ser tóxicos⁽²²⁾. La relación C:N que mantienen los géneros *Metarrhizium* y *Tolyposcladium* con el suelo ocasiona un efecto positivo en el aumento de la funcionalidad, demostrado

en el incremento de la biomasa fúngica y en la degradación e inmovilización del N, que en presencia de altos niveles de N en el suelo las especies de estos géneros modifican sus estructuras para elevar su potencial de resistencia a la desecación y a su vez aumenta la producción de microsclerotia (estructuras que ayudan a la fijación de conideas)⁽²³⁾. De esta forma estos hongos reducen la demanda de oxígeno y favorecen la inmovilización de nitrógeno en el suelo⁽²⁴⁾. Por otro lado se encuentran beneficiados ya que estos aprovechan la disposición en exceso de N para utilizarlo en procesos de degradación de polímeros orgánicos y transformación de nutrientes dejándolo disponible para procesos biológicos de otros organismos⁽²⁵⁾.

En el bloque 2 con tratamiento control se encontraron los géneros *Clonostachys* y *Morlierella*. Los miembros del género *Clonostachys* se desarrollan como mico parásito de otros hongos⁽²⁶⁾. A su vez son vulnerables a alteraciones en la mineralización proveniente de la fertilización del suelo, siendo considerados como bioindicadores de ecosistemas⁽²⁷⁾. Lo anterior justifica que solo se haya podido aislar el género *Clonostachys* y *Morlierella* de las parcelas control. En el caso de *Morlierella* es un género que se encuentra ampliamente relacionado con la presencia de C, está involucrado en la degradación de la celulosa⁽²⁸⁾.

El género *Morlierella* no se encuentra presente en los bloques con tratamiento de N, debido a que en este caso el exceso de nitrógeno presente en los suelos estudiados disminuye la producción radical en las plantas. Como resultado que se reduzcan las asociaciones en planta y hongo, por lo tanto que disminuye su crecimiento⁽²⁹⁾.

Los resultados de este estudio nos permitieron identificar diversos géneros de hongos que se encuentran asociados a la respuesta por estrés a la adición continua de nitrógeno en los suelos de la RBSF.

Conclusiones

- El empleo de técnicas de cultivo in vitro de microorganismos es útil para la identificación de hongos con niveles variables de resistencia a N.
- El diseño experimental seguido (segregación de parcelas control y con tratamiento) permitió identificar especies fúngicas con un grado diferente de tolerancia a la deposición de N.
- Se concluyó que los géneros *Metarrhizium* y *Tolyposcladium* presentes en este trabajo, se identifican como más resistentes a la elevación del nitrógeno. Se sugiere la utilización de los géneros antes mencionados en técnicas de inoculación, con la finalidad de ser aplicados en suelos perturbados por alta deposición de N.
- Se sugiere el uso de miembros del género *Clonostachys* y *Morlierella* como bioindicadores del impacto de la fertilización nitrogenada en ecosistemas tropicales.
- El porcentaje de reactivación de las cepas criopreservadas fue de 98%, lo que indica el éxito en la metodología de criopreservación que se empleó en los cultivos de hongos.

Agradecimientos

En el desarrollo de esta investigación y a su vez en la culminación de mi carrera universitaria, hago extenso mis agradecimientos al PhD. Amina Sánchez Rodríguez, que gracias a su dirección hizo posible el desarrollo de este trabajo; aportando con sus conocimientos y experiencia. Agradezco a mi colega Blgo. José Francisco Ochoa por su apoyo y aportes en la realización de este proyecto. A mi madre y familiares por estar presentes a lo largo de mis estudios.

Referencias bibliográficas

1. Cuesta F, Peralvo M, Valarezo N. Los Bosques Montanos de los Andes Tropicales. 2009. p. 1–41.
2. Torrachi S. Deforestación de Bosques Montanos y patrones de pérdida de hábitats en la región sur del Ecuador. 2002; Available from: <http://sig.utpl.edu.ec/sigutpl/staftpro/sig/paperambiental.PDF>
3. Baldos AP, Corre MD, Veldkamp E. Response of N cycling to nutrient inputs in forest soils across a 1000–3000 m elevation gradient in the Ecuadorian Andes. *Ecology* [Internet]. 2015;96(3):749–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1890/14-0295.1>
4. Montaña NM, Sandoval AL. Contaminación Atmosférica y salud. 2007;29–33.
5. Müller AK, Matson AL, Corre MD, Veldkamp E. Soil N₂O fluxes along an elevation gradient of tropical montane forests under experimental nitrogen and phosphorus addition. *Front Earth Sci* [Internet]. 2015;3(October):1–12. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/feart.2015.00066/abstract>
6. Craine JM, Brookshire ENJ, Cramer MD, Hasselquist NJ, Koba K, Marin-Spiotta E, et al. Ecological interpretations of nitrogen isotope ratios of terrestrial plants and soils. *Plant Soil*. 2015;396(1–2):1–26.
7. Castellanos O, Melissa D, Zabala B, Beatriz L, Botía R, Mauricio D, et al. caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (eUCALYPTUSSP) en codazzi, cesar (colombia). *Acta Biológica Colomb*. 2010;15(3):1–7.
8. Álvarez S. La descomposición de materia orgánica en humedales : la importancia del componente microbiano . *Ecosistemas*. 2005;14(2):17–29.
9. Ramírez AB. Estudio de la biodiversidad fúngica en el suelo del viñedo de la Finca La Grajera. Universidad la Rioja. 2014;
10. P. Paladines RL. Fundación Científica San Francisco. *Fund Científica San Fr*. 2003;5(2):139–41.
11. Parra S. Universidad del Azuay Facultad de Ciencia y Tecnología Autor Silvia Patricia Parra Suárez Danilo Minga Ochoa. 2011;4.
12. Saltos N. Extracción de ADN genómico y amplificación de la región ITS por PCR en el ascomicete marino *Lulworthia grandispora*. 2012;91.
13. Medina M, Weil E, Szmant AM. Examination of the *Montastraea annularis* Species Complex (Cnidaria: Scleractinia) Using ITS and COI Sequences. *Mar Biotechnol*. 1999;1(1):89–97.
14. Ramos Zapata JA. Capítulo III. Los organismos. Microorganismos del Suelo. Available from: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/429/organismos.pdf>
15. Ávila-Portillo LM, Madero JI, López C. Fundamentos De Criopreservación. *Rev Colomb Obstet Ginecol*. 2006;57(4):291–300.
16. Gutiérrez YAP. Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). *Rev Colomb Biotechnol*. 2009;11(2):8–18.
17. Pernía B, Demey JR, Ysvic Inojosa, Naranjo-Briceño L. Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclastico de hongos aislados de crudo y sus derivados: Un meta-análisis. 2012;(July 2015).
18. Snellman EA, Collins RP, Cooke JC. Utilization of fuel oils by fungi isolated from oceanic tar balls. *Lett Appl Microbiol*. 1988;6(5):105–7.
19. Arias E, Piñeros P. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. PhD Propos. 2008;1.
20. Jos E, Posso S. Evaluación de la producción de ácidos orgánicos en microorganismos rizosféricos y sus efectos en la solubilización de fosfatos. 2015;
21. Hernández SD. “Estudio transcriptómico de la interacción *Trichoderma*-tomate. Expresión del gen *amdS* de *Aspergillus nidulans* en *Trichoderma harzianum* y su papel en el metabolismo del nitrógeno y la respuesta de defensa de la planta.” *Cult la seducción* [Internet]. 2014; Available from: http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=h6y6BAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA11&dq=Universidad+de+salamanca&ots=6M7IkfNK_3&sig=YLozhRFcnOEw1w7tkrtoVBW4lnI
22. Gutierrez A, Saldarriaga Y. Observacion de la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* en soldados *Nasutitermes* sp. (Isoptera Termitidae). 2004. p. 6.
23. Mascarin GM, Kobori NN, de Jesus Vital RC, Jackson MA, Quintela ED. Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. *World J Microbiol Biotechnol*. 2014;30(5):1583–90.
24. Hermosín B, Nováková A, Jurado V, Láiz L, Porca E, Rogelio MA. Observatorio microbiológico de cuevas : evaluación y control de comunidades fúngicas en cuevas sometidas al impacto de actividades turísticas Caves microbial observatory : assessment and control of fungal communities in show caves. 2010;513–20.
25. Allison SD, Czimczik CI, Treseder KK. Microbial activity and soil respiration under nitrogen addition in Alaskan boreal forest. *Glob Chang Biol*. 2008;14(5):1156–68.
26. Rolando Hermes Cerda Bustillos, Soto G. Calidad de suelos en plantaciones de cacao (*Theobroma cacao*), banano (*Musa AAA*) y plátano (*Musa AAB*) en el valle de Talamanca, Costa Rica. 2008;Maestría e:66.
27. Moratto C, Martínez LJ, Valencia H, Sánchez J. The effect of land use on phosphate solubilising fungi and diazotrophic bacteria on the bleak uplands of páramo of Guerrero, Cundinamarca department. *Agron Colomb* [Internet]. 2005;23(2):299–309. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652005000200015&lng=en&nrm=iso&tlng=es
28. ortiz c, rubio a, benito m. Influencia de la composición vegetal en la actividad microbiana del suelo en el límite de árbol en el sistema central. *Steww Agric L Use Baseline* 2015. 2015;1:1–12.
29. Salinas C uriel flores. Evaluación de la Tasa de Crecimiento de *Phytophthora cinnamoni* Rands en Medios Alternativos. 2015;
30. MO BIO Laboratories, Inc, 2017. Isolate high quality DNA from microbial cultures. [online] Available at: <https://mobio.com/products/dna-isolation/microbial/ultra-cleanr-microbial-dna-isolation-kit.html> [Accessed 28 Sep. 2016].
31. Lynch J. M. y Hobbie J.E. 1983. Microorganisms in action: concepts and applications in Microbial ecology. Blackwell Scientific Publications, Gran Bretaña.

Recibido : 30 mayo 2017

Aprobado: 20 junio 2017

RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

Estandarización de un ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de anticuerpos IgG contra el antígeno de superficie recombinante del virus de la Hepatitis B inducidos en conejos New Zealand.

Standardization of an immunoenzymatic assay for the quantification of IgG antibodies against the recombinant surface antigen of Hepatitis B virus induced in New Zealand rabbits

Yosbany Pérez-Barrios*, Yisabel Aranguren-Mazorra, Caridad Zayas-Vignier, Mabel Hernández-Cedeño, Carlos Espinosa-Viñals, Yanelly Tirado-Hernández, Abel Fajardo-Sánchez, Maylín Álvarez-Tito, Alex Quintero-Pérez, Dagmar García-Rivera, Reinaldo Acevedo Grogues+.

DOI. 10.21931/RB/2017.02.04.7

RESUMEN

La infección por el virus de la Hepatitis B está extendida por todo el mundo. Actualmente, miles de personas mueren a causa de este virus, por lo que es una necesidad desarrollar vacunas que protejan contra este patógeno. Existen vacunas basadas en el antígeno recombinante de superficie del virus de la Hepatitis B donde la eficacia protectora de la vacunación contra el virus está directamente relacionada con la inducción de anticuerpos contra el antígeno de superficie. Por tal razón, es muy importante de contar con una técnica sensible, específica y precisa que sea capaz de detectar niveles de anticuerpos en sueros. En este trabajo se representan los resultados del proceso de estandarización de un ELISA indirecto de cuantificación que se desarrolló con sueros de conejos New Zealand inmunizados con la vacuna comercial Heberpenta-L y una vacuna experimental combinada. En los cuales se determinó la concentración óptima de recubrimiento, el intervalo y linealidad de la curva, la precisión intra e interensayo, la especificidad y el límite de detección. La curva de calibración, generada con un estándar interno, presentó un buen ajuste lineal y un intervalo entre las diluciones 1/200 a 1/12800. Los coeficientes de variación en los ensayos de precisión estuvieron en los intervalos establecidos para cada uno ($\leq 10\%$, $\leq 20\%$ respectivamente). El ensayo presentó una especificidad óptima y se determinó el valor de corte que fue de 18,086 UA/mL. Estos resultados avalan el empleo de esta técnica en los laboratorios del Instituto Finlay de vacunas para la evaluación preclínica de nuevos candidatos vacunales combinados que protejan contra la Hepatitis B.

Palabras claves: Estandarización, ELISA, HBsAg, Hepatitis B

SUMMARY

Hepatitis B virus infection is widely spread all over the world. Currently, thousands of people die from this virus, so effective vaccines need to be developed to protect against this pathogen. The most important vaccines are based on the recombinant surface antigen of Hepatitis B virus. The protective efficacy of vaccination against Hepatitis B is directly related to the induction of antibodies against this antigen, hence the need for a sensitive, specific and accurate technique to be able to detect levels of antibodies in sera. In this work we present the results of the standardization process of an indirect quantization ELISA, where determine the optimum coating concentration, the range and linearity of the curve, the intra and interassay precision, the specificity and the detection limit. The calibration curve was obtained with an internal standard. This showed a good linear fit and in a range of dilutions between 1/200 to 1/12800. The coefficients of variation in the precision tests were within the intervals established for each ($\leq 10\%$, $\leq 20\%$ respectively). The assay presented an optimum specificity and the cutoff value was determined to be 18.086 AU / mL. These results support the use of this technique in the Laboratory of Preclinical Immunology of the Finlay Institute of Vaccines for the evaluation of new combined vaccine candidates to protect against Hepatitis B.

Key words: Standardization, ELISA, HBsAg, Hepatitis B

Introducción

El virus de la hepatitis B (VHB), descrito en 1963, pertenece a la familia Hepadnaviridae. Cuenta con una nucleocápside icosaédrica y una envoltura lipídica. El genoma consiste en una molécula circular de ADN bicatenario de 3,2 kb, cuya cadena positiva está parcialmente incompleta en su extremo ^{3, 1}. La infección por VHB es una de las infecciones virales crónicas más frecuente en el mundo. Un estimado de 2 mil millones de personas han sido infectadas y más de 350 millones son portadores crónicos del virus. En el 2010, la infección por VHB clasificó entre las principales prioridades de salud del mundo, y fue la décima causa principal de muerte (786 000 muertes al año). ² La prevención mediante vacunación es la única estrategia eficaz para evitar la enfermedad. Desde

1987, vacunas recombinantes derivadas de levaduras han sido licenciadas. Estas contienen la proteína de superficie del virus de la hepatitis (proteína S, HBsAg). ³ La producción de vacunas por técnicas de ADN recombinante ha posibilitado expresar el gen S del antígeno de superficie del virus en varios hospederos. ⁴ El antígeno se produce actualmente en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* y *Pichia pastoris* y también en células de mamíferos. Estos antígenos recombinantes forman parte de vacunas preventivas establecidas en el mercado. ^{5, 6} En la actualidad, el HBsAg se encuentra formando parte también de nuevas formulaciones combinadas, que han permitido la inmunización simultánea contra múltiples enfermedades. ⁷

¹ Instituto Finlay de Vacunas. Departamento de Evaluación de Biológicos. Ave 17, esq 198, Siboney, Playa, La Habana, Cuba

E-mail de correspondencia: *ypbarrios@finlay.edu.cu; +racevedo@finlay.edu.cu

La eficacia protectora de la vacunación contra la Hepatitis B está directamente relacionada con la inducción de anticuerpos anti-HBsAg.⁸ Existen varios modelos animales en estudios preclínicos que pueden ser utilizados para evaluar la inducción de anticuerpos anti-HBsAg, entre ellos ratones, curieles y conejos.⁶ A partir de la necesidad actual de desarrollar vacunas que protejan contra varios antígenos, en el Instituto Finlay de Vacunas de Cuba existe un proyecto para la obtención de una vacuna combinada. Esta nueva formulación contendrá el HBsAg, con variaciones en la composición antigénica y del sistema de adyuvante. Para determinar la respuesta humoral inducida contra el HBsAg en la nueva formulación combinada, es necesario contar con una técnica inmunoenzimática de tipo ELISA. Por tal razón, se planteó como objetivo principal la estandarización de dicha técnica, utilizando conejos como modelo preclínico experimental.

Materiales y Methods

Selección del soporte sólido

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos Maxi Sorp (Nunc Dinamarca) de alta captación. Este material fue seleccionado dada su excelente calidad óptica, por facilitar enlaces estables y su dureza mecánica.

Muestras empleadas

Antígeno

Como antígeno de captura se empleó el HBsAg, lote (02/IFA/c4185) con una concentración inicial de 0,7 mg/mL. Este antígeno fue producido y gentilmente donado por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba.

Vacuna combinada: Se emplearon 4 lotes de una vacuna experimental combinada, los cuales fueron elaborados por el grupo de formulación del Laboratorio de Inmunología Preclínica, perteneciente al departamento de Evaluación de Biológicos del Instituto Finlay de Vacunas. Este nuevo candidato vacunal contiene en su formulación el antígeno de interés en combinación con otros inmunógenos absorbidos en fosfato de aluminio. Todos los antígenos constituyentes se encuentran formando parte de vacunas licenciadas en la actualidad.

Vacuna Heberpenta- L: Esta vacuna fue gentilmente donada por el Centro Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba. El lote comercial utilizado fue 4AA1406/0. Esta vacuna en su formulación está constituida por varios ingredientes antigénicos activos purificados, entre las que se encuentra la proteína recombinante de superficie de Hepatitis B.

Placebo: Solución de fosfato de aluminio (AlPO₄) a la misma concentración de la formulación de la vacuna combinada.

Animales de experimentación

Se emplearon conejos machos de la raza New Zealand, con un peso aproximado entre 1,5 y 1,8 Kg provenientes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Cuba. Los animales fueron alojados y adaptados según las normas establecidas para el trabajo con animales de laboratorio. Se mantuvieron 7 días en cuarentena antes de iniciar los experimentos, con libre acceso al agua y a la comida. Los experimentos realizados fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto, siguiendo las normas nacionales e internacionales para el trabajo con animales (EEC Council Directive 86/609. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 2010).⁹ Preparación de los materiales de referencias de trabajo

Esquema de inmunización

El esquema de inmunización contó con cuatro lotes de la vacuna combinada, un placebo y un grupo control positivo del experimento inmunizado con la vacuna comercial Heberpenta-L. Se inmunizaron con cada vacuna a 5 conejos y el placebo a 10 conejos por vía intramuscular para un total de 35 animales. Se empleó un esquema de tres dosis de 0,25 mL con un intervalo de

21 días entre dosis.

Suero hiperinmune

Se seleccionaron los sueros de animales con densidades ópticas superiores a 1 provenientes de los grupos inmunizados con las vacunas experimentales y se les dio una dosis de refuerzo de la vacuna experimental. Luego de 21 días, los animales fueron desangrados para recolectar la mayor cantidad de sangre posible. Posteriormente, se preparó la mezcla de sueros que se utilizó para la obtención del suero estándar interno.

Obtención del estándar

Para la realización del estándar interno de calibración, el suero hiperinmune de conejo fue purificado por un método cromatográfico, en este caso una cromatografía de afinidad empleando una matriz de proteína A Sepharose 4 Fast Flow. Se siguió el método descrito por Ulloa M et al., 2003¹⁰, con modificaciones respecto a los tampones de unión (PBS 1x pH 7,4) y elución (ácido cítrico 0,1 M pH 3). Luego se le realizó a la fracción específica (AcP de conejo) un desalado contra PBS 1X.

Determinación de proteínas totales

Para la determinación de proteínas totales del suero purificado, se utilizó un método colorimétrico empleando el estuche comercial BCA™ Protein Assay Kit según las recomendaciones descritas por el fabricante. Los resultados de la determinación de proteínas fueron leídos y procesados empleando un lector de microplacas Multiskan, a una longitud de onda de 540 nm y el software de cuantificación para Multiskan (Ascent 2.6®), respectivamente.

Pureza

La pureza del suero purificado se evaluó mediante SDS-PAGE al 12,5% en condiciones reductoras. Las imágenes del gel realizado fueron capturadas y procesadas utilizando el software ImageJ v1.50.

Estandarización de los ensayos inmunoenzimáticos

Recubrimiento: Se emplearon sueros positivos con títulos de anticuerpos contra el HBsAg, sueros negativos (placebo) y el blanco reactivo (EDTA- BSA 1%- PBS-Tween 20 al 0,05%). Se evaluaron concentraciones entre 0 y 40 µg/mL. Se definió como la concentración óptima de recubrimiento a una temperatura, tiempo y amortiguador definido, aquella en la que el suero estándar o el control positivo alcanzó la mayor señal, generalmente mantenida a concentraciones superiores ("meseta"), y la menor señal para el control negativo y el blanco reactivo.

Titulación del conjugado: Se utilizaron los mismos sueros descritos en el punto anterior. El conjugado se tituló en diluciones entre 1:6000 y 1:16000, con incrementos en 2000. Se seleccionó como dilución óptima aquella donde la señal del suero positivo fue mayor, y las del suero negativo y el blanco reactivo, menor. **Evaluación del rango lineal de la curva:** El intervalo de la curva se determinó mediante tres ensayos en los que se evaluaron 12 diluciones seriadas con factor dos del suero hiperinmune purificado, comenzando en 1/50. En cada ensayo se procesaron seis réplicas del suero, para un total de 18 réplicas. Se promediaron las réplicas y se seleccionó el rango de la curva compuesta por siete puntos, en la que se alcanzó un coeficiente de determinación (R^2) $\geq 0,98$, un coeficiente de correlación (r) $\geq 0,99$. Para cada ensayo, el coeficiente de variación (CV) debe ser menor del 10% entre las concentraciones de cada punto, una vez corregidas por el factor de dilución. El CV debe ser menor del 20% entre los tres ensayos realizados. El ajuste se determinó mediante un análisis de regresión lineal.

Paralelismo

Esta prueba fue empleada para avalar la linealidad y estimar la exactitud del método. Se procesaron en el mismo ensayo dos réplicas de cada punto de la curva de calibración. Se incluyeron al menos dos réplicas de siete diluciones de suero, desde 1/100 hasta 1/6400, de cuatro muestras procedentes de los animales inmunizados con la vacuna combinada. Se calculó el R^2 de cada curva obtenida ($R^2 \geq 0,98$), así como el CV entre las

concentraciones de cada muestra, una vez corregidas por el factor de dilución, que debe ser inferior al 10%.

Precisión

Intraensayo: La variabilidad intrínseca del ELISA se determinó mediante la precisión intraensayo. Se evaluó la repetibilidad a través del análisis de cinco réplicas, de cuatro sueros de concentraciones que estuvieran en el rango de la curva de calibración. Se determinaron el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Este último parámetro estadístico no debía superar el 10% para considerar la precisión intraensayo como óptima.¹¹

Interensayo: Para su determinación se seleccionaron tres sueros de diferentes concentraciones y se evaluaron por triplicado en cuatro diluciones seriadas. La precisión interensayo se evaluó bajo tres condiciones diferentes: tres analistas un mismo día, un mismo analista mediante ensayos en paralelo y en días diferentes. El criterio de aceptación fue que el CV no supera el 20%.¹²

Especificidad. Se evaluó a través de dos metodologías:

Se evaluaron individualmente los sueros de los 5 conejos inoculados con placebo mediante el ELISA. En la placa se aplicó la curva de calibración correspondiente como control positivo. Se estableció como criterio de aceptación que la respuesta del placebo debía ser inferior al primer punto de la curva de calibración.

La segunda metodología seguida para determinar la especificidad del ELISA de cuantificación estuvo encaminada a demostrar que los sueros de conejos inmunizados con diferentes inmunógenos polisacáridicos y proteicos no producen señal contra el antígeno de recubrimiento. Se incluyó además un suero de conejo de HBsAg como muestra francamente positiva.

Valores de corte: Para establecer los valores de corte que permitan discriminar los animales que respondieron adecuadamente de aquellos que no, se procesaron los resultados de la respuesta generada por los animales inmunizados con el control negativo (placebo). Los límites de corte se estimaron a partir del cálculo de la media de la respuesta de anticuerpos en unidades arbitrarias por mililitros (UA/mL) más dos desviaciones estándar (DE), para un 95% de confianza.

Descripción de los ELISA

En todos los casos se utilizó un ensayo inmunoenzimático en fase sólida, cuantitativo, de tipo indirecto.

Para la sensibilización de las placas de 96 pocillos Maxi Sorp (Nunc Denmark) se aplicaron 100 μ L del HBsAg como antígeno de captura a la concentración óptima de recubrimiento escogida. Se empleó como solución de recubrimiento, buffer fosfato salino (PBS) 1X pH 7,2. Las placas se incubaron durante 12–18 h a 4 °C en cámara húmeda. Después, fueron lavadas tres veces con 300 μ L por pocillos en un lavador de placas de ELISA (SUMA) con solución de lavado (H_2O (d)-Tween 20 al 0,05%). Las muestras de sueros y el suero estándar se diluyeron con solución amortiguadora (EDTA-BSA 1% -PBS-Tween 20 al 0,05%). Las muestras y el control se aplicaron en 100 μ L por pocillo y por duplicado; se realizaron diluciones seriadas, en base 2.

Las placas se incubaron 1 h a 37 °C en cámara húmeda y más tarde se lavaron de la forma descrita. Se adicionaron 100 μ L por pocillo del conjugado en solución amortiguadora (EDTA-BSA 1% -PBS-Tween 20 al 0,05%). Se usó un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano picante (SIGMA, USA). Se incubaron nuevamente 1 h a 37 °C en cámara húmeda y se aplicaron 100 μ L por pocillo de disolución sustrato (H_2O_2 como sustrato, 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina como cromógeno, buffer citrato pH 5). Las placas se incubaron 25 min en la oscuridad y se detuvo la reacción con 50 μ L por pocillo de solución de NaOH 2,5 N. Se leyeron las placas a 450 nm en un lector de placas de ELISA (Thermo Scientific).

Análisis Estadístico.

Las concentraciones de anticuerpos IgG contra HBsAg se determinaron mediante el programa computacional ELISA for Windows, del Centro para Enfermedades Infecciosas, desarrollado por Plikaytis y Carlone, 2005.¹³

La desviación estándar (DE), el coeficiente de variación (CV) y

el coeficiente de determinación (R^2) se calcularon mediante el programa Microsoft Office Excel 2013. Los gráficos y tablas se construyeron en este mismo programa.

La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis se empleó para la comparación estadística de los tratamientos experimentales, con un nivel de significación del 95%. De existir diferencias, se aplicó la prueba no paramétrica de Dunnett de comparación múltiple. Se utilizó el programa GraphPad Prism 6.0. para graficar y analizar los datos experimentales.

Resultados y Discusión

El desarrollo de vacunas combinadas se ha convertido en un tema de gran expectativa para la prevención de diferentes enfermedades mediante la vacunación. Este tipo de vacunas presenta múltiples ventajas como la reducción del costo de administración, la inmunización y protección contra diferentes enfermedades y el aumento de la aceptación de los programas de inmunización por la población y el personal médico en general.¹⁴

Las exigencias legales para la introducción de una nueva vacuna combinada incluyen ensayos preclínicos y clínicos que demuestren una apropiada respuesta inmunológica frente a cada antígeno incluido. Además que no ocurran interferencias en las respuestas inmunes que ellos inducen, y principalmente que la eficacia protectora, así como los efectos secundarios, no superen en número y gravedad a los que las vacunas monovalentes o no combinadas inducen por separado. Las vacunas contra las infecciones causadas por el VHB, obtenidas por ingeniería genética, han conseguido superar todos estos requisitos cuando se han presentado en forma monovalente o combinada con otros antígenos.¹⁵

A partir de la necesidad de desarrollar vacunas que combinen un mayor número de antígenos en una sola formulación y que protejan contra varios patógenos, se ha propuesto un nuevo proyecto de vacuna combinada para la infancia que contiene HBsAg como uno de los componentes antigénicos de esa formulación.

La cuantificación de anticuerpos frente a HBsAg se puede determinar mediante ELISA, con el empleo de un estándar previamente calibrado. En la actualidad existen ELISAs para dicha cuantificación, pero la gran mayoría de estos inmunoensayos son de tipo sándwich o inhibición, particularmente por la necesidad de una mayor sensibilidad que se requiere en la cuantificación de anticuerpos anti- HBsAg en muestras humanas. En este trabajo se reportan los resultados que se obtuvieron durante la estandarización de un ELISA de tipo indirecto que demostró ser suficiente para cuantificar la respuesta anti- HBsAg en suero de conejos New Zealand inmunizados con una combinación de antígenos donde se incluyó el mencionado antígeno de hepatitis B. Este trabajo permitirá no solo contar con un método y estándares para la evaluación de respuestas contra hepatitis B sino que permitirá el estudio preclínico de formulaciones vacunales combinadas.

Debido a que no existía un trabajo previo en el Instituto Finlay de Vacunas para detectar y cuantificar anticuerpos contra este antígeno, se decidió estandarizar un ELISA de cuantificación de tipo indirecto y obtener un estándar interno para la evaluación de los candidatos vacunales combinados en fase de investigación preclínica.

La concentración óptima de recubrimiento escogida fue aquella donde el control positivo alcanzó la mayor señal y el control negativo y el blanco reactivo la menor, a una temperatura, tiempo y amortiguador definido.¹⁶

En la figura 1 se puede observar la concentración de recubrimiento óptima para este ensayo, la cual resultó ser 1,25 μ g/mL, primera concentración en la que se alcanzó la meseta. Para este ensayo se decidió escoger un punto mayor de recubrimiento, en este caso 2,5 μ g/mL. Este criterio se basó en lo planteado por Ochoa R et al., 2000¹⁶, el cual expresa que en la práctica se prefiere recubrir

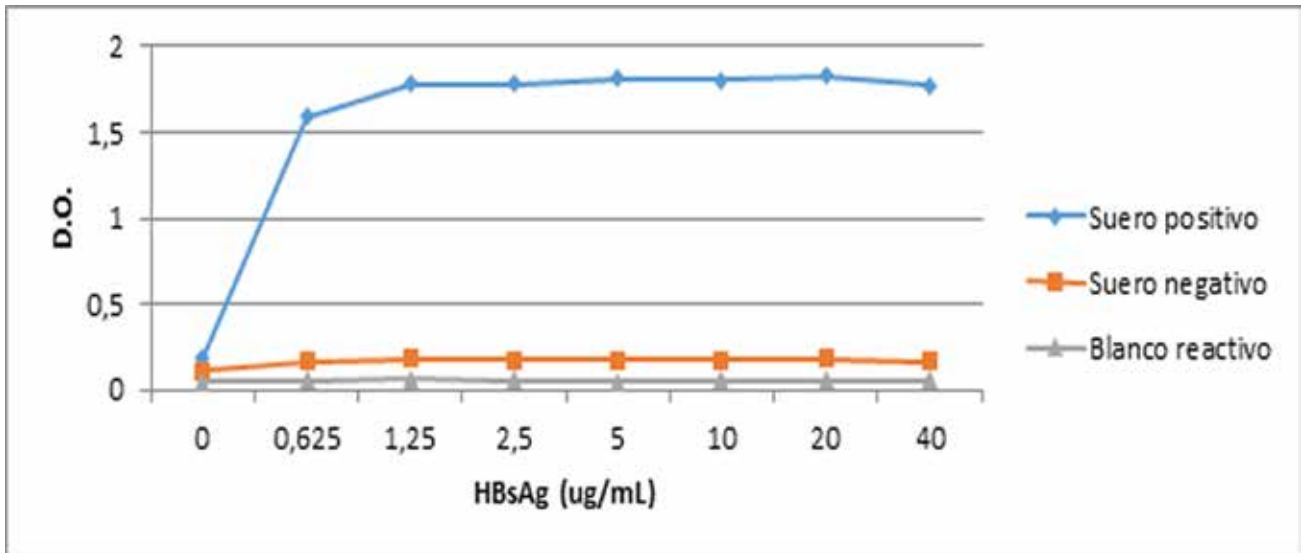


Figura 1. Evaluación de la concentración óptima de recubrimiento



Figura 2. Evaluación de la dilución óptima del conjugado. Diluciones del conjugado a partir de 1/6000 hasta 1/16000. Control positivo (CP, mezcla de sueros respondedores contra el HBsAg), Control negativo (CN, mezcla de sueros de animales inmunizados con placebo), Blanco reactivo (BR, disolución de dilución).

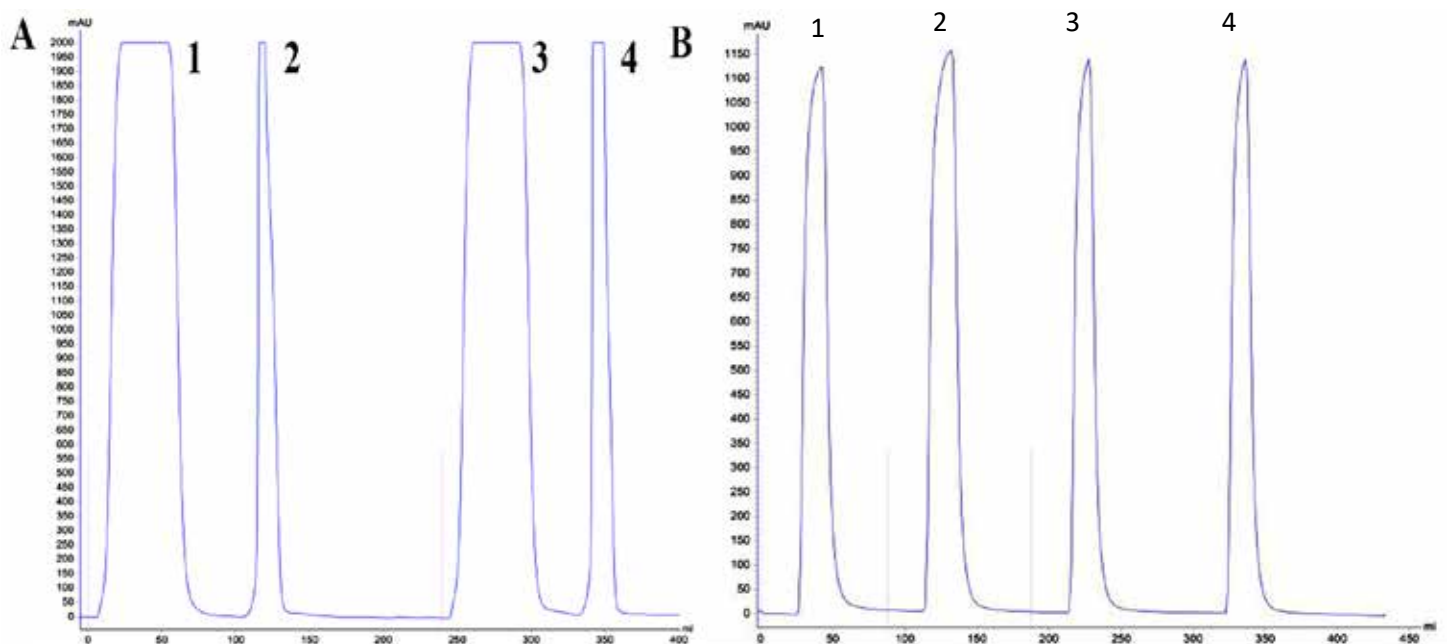


Figura 3. A) Cromatografía de afinidad utilizando una matriz de proteína A. Se realizaron dos corridas de 32 mL cada una. Los picos 1 y 3 corresponden a la fracción inespecífica y pico 2 y 4, a la fracción específica. B) Cromatografía de exclusión molecular (desalado) a la fracción específica, empleando una matriz Sephadex G-25. Los cuatro picos mostrados se corresponden con cuatro corridas de 18 mL cada una.

con un ligero exceso de material biológico siempre y cuando se cumplan las condiciones.

En la figura 2 se muestran los resultados del estudio para determinar la dilución óptima del conjugado empleado. Se observó que la mayor relación del suero positivo con respecto al suero negativo y el blanco reactivo se obtuvo en la dilución 1:10 000. A esta dilución, se alcanzaron densidades ópticas para el suero positivo de 1,3 y 0,2 para el suero negativo. Como se pudo observar, diluciones inferiores a 1/10 000 generaron valores más altos del suero positivo, pero también para el suero negativo y el blanco reactivo. Además se prefiere utilizar diluciones de trabajo de conjugado lo más diluidas posibles, siempre y cuando cumpla los parámetros establecidos.

La curva de calibración se realizó a partir de un estándar interno, el cual se generó a partir de la mezcla de varios sueros respondedores y su posterior purificación. La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad con proteína A, seguida del desalado de la fracción de interés utilizando la columna Sephadex G-25. Los cromatogramas de cada etapa de purificación se muestran en la figura 3.

En la figura 3A se observan dos picos que sobrepasan el valor máximo de absorbancia del equipo (2000 mAbs), lo que indica la presencia de grandes cantidades de proteínas en ambos. El primer pico corresponde a la fracción que no se une a la matriz de proteína A (fracción inespecífica) y que por tanto eluye en presencia del tampón de unión. Esta fracción está compuesta de todos aquellos contaminantes de origen proteico que se encuentran en altas concentraciones en sangre como albúmina, transferrina, alfa-2-macroglobulina, etc. El segundo pico, por su parte, correspondiente a la fracción específica (que contiene a la molécula de interés y que eluye al aplicar el tampón de elución), también satura la señal máxima del equipo. Posteriormente se neutralizó el pH de dicha fracción antes del desalado contra PBS (Figura 3 B).

La concentración final de proteínas del AcP (anticuerpo policlonal) de conejo, fue de 3,45 mg/mL. El recobrado del proceso de purificación fue estimado en 10,78 mg de AcP por mililitro de suero.

La pureza de los anticuerpos purificados se evaluó mediante una electroforesis en condiciones reductoras en presencia de SDS. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4A. En la misma se observan 6 carriles de izquierda a derecha, donde en 1 y 6 se corrió el patrón de peso molecular. Los carriles 2, 3, 4 y 5 pertenecen al suero sin purificar, fracción inespecífica, fracción específica sin desalar y luego de desalar, respectivamente. Se puede constatar que el proceso de purificación fue eficiente pues a medida que avanzó, se eliminaron la mayoría de los contaminantes presentes en el suero. Esto se puede apreciar al contrastar los carriles 2 y 3, que muestran las bandas correspondientes al AcP y otras proteínas contaminantes; y los carriles 4 y 5. En estos últimos, los pesos moleculares de las bandas de mayor intensidad son de 50kDa y 25kDa aproximadamente lo que se corresponde a la cadena

pesada y ligera de los AcP, respectivamente. También en estos carriles se observa la disminución de algunos contaminantes. El valor de pureza obtenido para el AcP purificado fue de 95% (análisis densitométrico con programa el ImageJ v1.50), que puede ser considerado de alta calidad y por tanto permite el empleo del AcP en técnicas inmunoquímicas.¹⁷ Luego de la purificación del suero hiperinmune, se determinó el comportamiento de la curva, la cual mostró el típico comportamiento sigmoidal (figura 5).

Se seleccionaron las siete diluciones con las que se alcanzó el coeficiente de determinación y correlación con valores por encima a los establecidos, según lo descrito en Materiales y Métodos. Las diluciones seleccionadas para la construcción de la curva de calibración fueron desde 1/200 a 1/12 800 (figura 5), alcanzando un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9939 y un coeficiente de correlación (r) de 0,9983. El estándar interno recibió una asignación arbitraria de 1000 (UA/mL), para su empleo como curva de calibración. La obtención de un estándar interno permitió suplir la carencia de un suero de referencia internacional de conejo en nuestro laboratorio. A pesar de que existen dos sueros estándar de referencia internacional para ser usado en ensayos diseñados para cuantificar anticuerpos contra HBsAg en suero humano⁶, no se pueden emplear en este ensayo al no ser generado en la misma especie.

Para la determinación del paralelismo de la curva, se evaluaron muestras de alta, mediana y baja concentraciones. La curva se montó en las siete diluciones seleccionadas y las muestras se aplicaron en seis diluciones. En todos los casos los R^2 obtenidos fueron superiores a 0,98 y el CV entre las concentraciones de cada muestra fue inferior al 10%. Estos resultados avalan la linealidad de la respuesta y permitieron seleccionar las diluciones que mantenían el paralelismo con la curva para ser usadas en los ensayos posteriores.

En la tabla 1 se muestran los resultados de la precisión intraensayo. En todos los casos se alcanzaron valores de variación inferiores al 6%. Se pudo garantizar la repetibilidad del ELISA para la cuantificación de anticuerpos IgG.

Se presentan las concentraciones (UA/mL) calculadas por quintuplicado de cuatro sueros y el promedio, desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV).

Muestras	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 5	Promedio	DE	CV(%)
1	248,203	254,573	250,311	270,681	256,014	255,956	8,814	3,443
2	332,487	356,066	324,616	316,917	358,385	337,694	18,678	5,531
3	431,201	438,176	454,926	421,981	441,98	437,653	12,294	2,809
4	145,078	142,312	138,832	136,851	143,859	141,386	3,453	2,442

Tabla 1: Precisión intraensayo

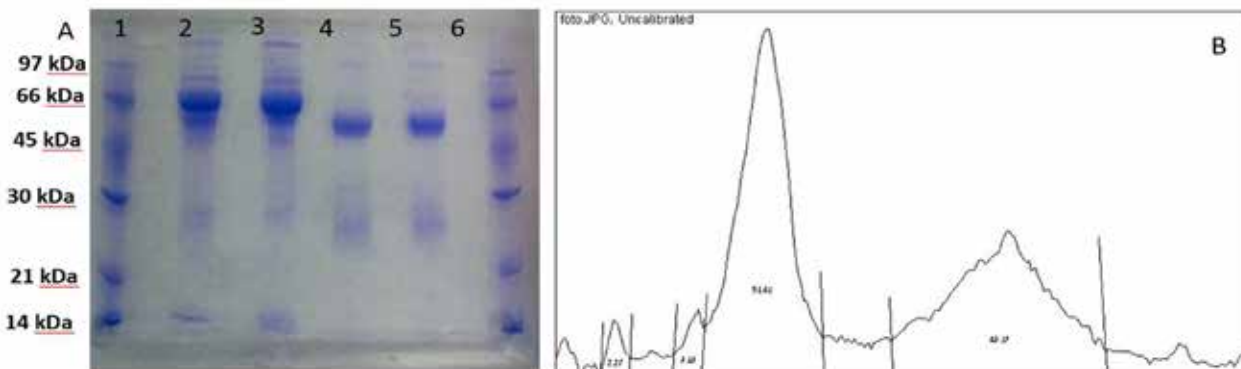


Figura 4. SDS-PAGE en condiciones reductoras. A) Corridas de las fracciones obtenidas. Los carriles 1 y 6 corresponden al patrón molecular. Los carriles 2 y 3 pertenecen al suero y fracción inespecífica con dilución 1/20 y 1/10 respectivamente. Los carriles 4 y 5 pertenecen a la fracción específica antes y después del desalado. Por carril se aplicaron 10 μ L de muestra. B) Electroforetograma del carril 5. Cada pico, de izquierda a derecha, se corresponde con las bandas que aparecen de arriba hacia abajo en dicho carril.

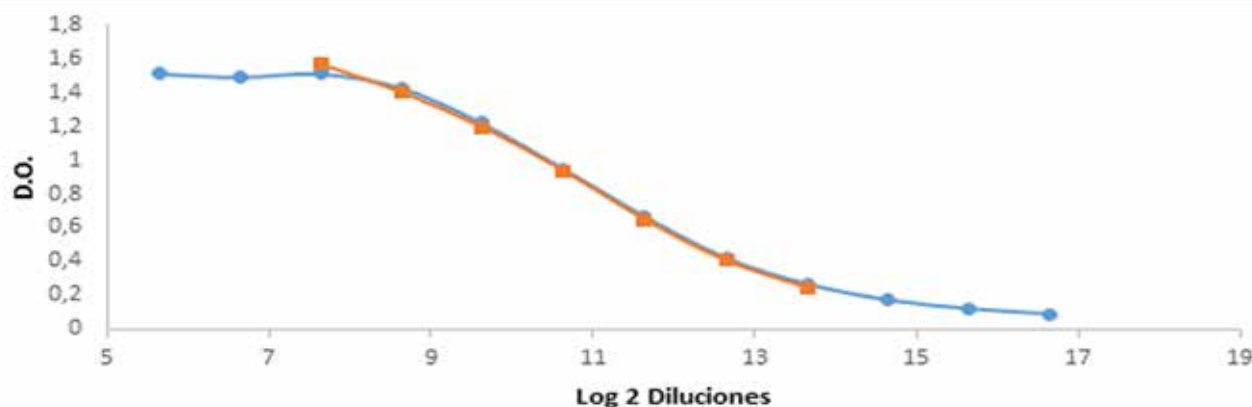


Figura 5. Exploración del rango lineal de la curva. Diluciones entre 1/50 a 1/102 400. Rango lineal de la curva (en rojo). Diluciones entre 1/200 a 1/12800. $R^2 = 0,9939$; $r = 0,9983$.

Tabla 2: Precisión interensayo por placa

Muestras	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Promedio	DE	CV (%)
1	293,018	368,525	329,781	330,441	37,758	11,426
2	1467,872	1154,323	1247,445	1289,88	161,024	12,484
3	265,294	224,382	238,477	242,718	20,783	8,563

Concentraciones (UA/mL) de IgG contra HBsAg de tres sueros determinadas por un mismo analista en un mismo día. DE: Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación.

Tabla 3: Precisión interensayo realizada por el mismo analista en tres días diferentes

Muestras	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio	DE	CV (%)
1	360,075	348,839	379,582	362,832	15,556	4,287
2	782,114	885,903	801,34	823,118	55,216	6,708
3	267,646	224,783	232,409	241,613	22,866	9,464

Se presentan las concentraciones (UA/mL) calculadas de tres sueros, el promedio, desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV).

En la tabla 2 y 3 se muestran los resultados obtenidos de la precisión interensayo realizados por un mismo analista en ensayos en paralelo y en tres días diferentes. En ambos casos se obtuvieron coeficientes de variación por debajo del 13%.

Tabla 4: Precisión interensayo por analista en un mismo día.

Muestras	Analista 1	Analista 2	Analista 3	Promedio	DS	CV (%)
1	441,354	548,910	422,826	471,030	68,079	14,453
2	3.077,754	2.732,495	2.365,077	2.725,109	356,396	13,078
3	630,855	675,646	616,874	641,125	30,702	4,789

Se presentan las concentraciones (UA/mL) calculadas de tres sueros por tres analistas en un mismo día, el promedio, desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV).

En la tabla 4 se muestran los resultados de la precisión interensayo por analista, la cual se corresponde con la reproducibilidad del ELISA. En este caso se llevó a cabo por tres analistas diferentes en el mismo laboratorio. Se obtuvieron valores de variación inferiores al 15%. Teniendo en cuenta que el máximo establecido para este ensayo era del 20%, podemos afirmar que se lograron resultados favorables que demuestran la reproducibilidad del ELISA.

El indicador precisión evalúa la propiedad del método de brindar resultados similares en momentos diferentes y en condiciones distintas, ya sea de analistas, reactivos, e instrumentos. Los

resultados obtenidos en el ensayo de precisión estuvieron dentro del intervalo establecido como óptimo para ese parámetro.¹⁸

En relación a la primera metodología descrita en los materiales y métodos para evaluar la especificidad del ELISA, se determinó que la respuesta del placebo era inferior al primer punto de la curva de calibración correspondiente. Esto corrobora que los componentes utilizados en la formulación inmunizada al grupo placebo, o sea el adyuvante fosfato de aluminio y el tampón de fosfato no interfirieron con la respuesta inducida al antígeno de interés.

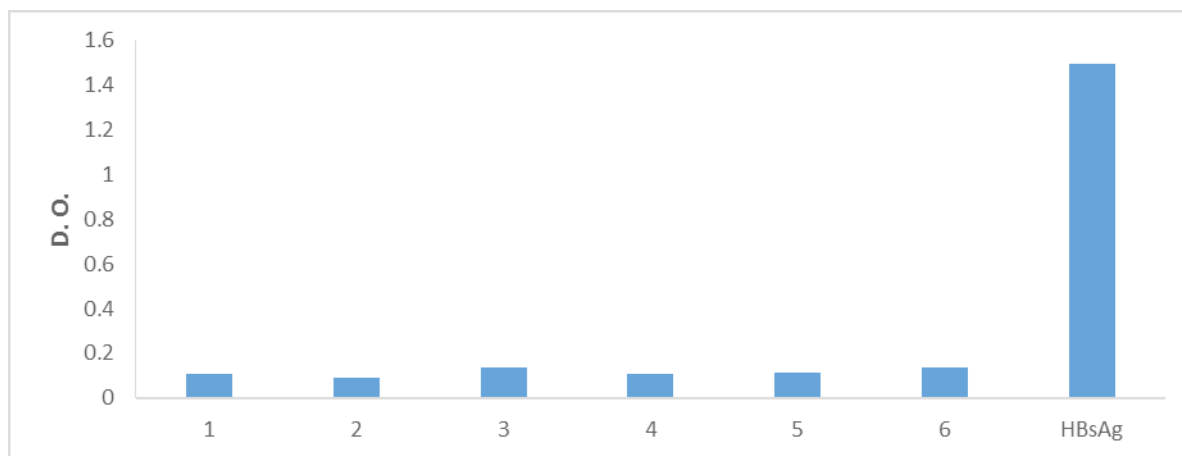


Figura 6. Especificidad. Se observan las densidades ópticas de un suero positivo contra HBsAg y 6 sueros de conejos inmunizados con conjugados de *S. pneumoniae* 19A-TT (suero 1) y PsC 6A-TT (suero 2), mezcla de conjugados neumococos 1-TT, 5-TT, 6B-TT, 14-TT, 18C-TT, 19F-TT, 23 F-TT (suero 3), toxoide tetánico (suero 4), toxoide diftérico (suero 5), PsC Vi de *Salmonella* Typhi (suero 6), HBsAg (suero 7). DO: Densidad óptica.

En la figura 6 se muestran los resultados de la especificidad del ELISA correspondientes a la segunda metodología descrita. Se evaluaron sueros de conejos inmunizados con polisacáridos de neumococo conjugados a toxoide tetánico como proteína portadora, toxoide tetánico, toxoide diftérico y polisacárido Vi. Se incluyó una mezcla de sueros inmunizados con el HBsAg como control positivo. Como se puede observar, los seis sueros inmunizados presentaron respuestas inferiores a 0,2 de densidades ópticas en todos los casos. La absorbancia de la mezcla de los sueros positivos fue muy superior a los sueros control negativo. Por lo que se demostró que la respuesta generada se debió solo al antígeno de interés y no a señales inespecíficas generadas por los otros inmunógenos.

La demostración de la especificidad constituye una fortaleza del ensayo. Los sueros de los animales contienen, además de los anticuerpos específicos contra el antígeno de interés, otros anticuerpos no específicos. Por esto es deseable que el ensayo de cuantificación posea una especificidad tal, que detecte solamente el analito para el cual se diseñó, sin interferencia de contaminantes de la matriz.¹² Por lo que los resultados obtenidos confirman la especificidad del ensayo para detectar anticuerpos IgG contra el HBsAg.

Animales	D.O.	UA/mL
1	0,251	13,123
2	0,323	18,007
3	0,263	13,893
4	0,274	14,613
5	0,283	15,213
6	0,308	16,884
7	0,272	14,482
8	0,247	12,861
9	0,269	14,284
10	0,241	12,446
Promedio	0,273	14,581
DE	0,026	1,753
Valor de corte	0,325	18,086

Tabla 5. Valor de corte establecido para esta técnica. En esta tabla se muestran las D.O. de los sueros de 10 animales inmunizados con placebo y los valores de concentración en UA/mL de cada animal. Además, se presentan el promedio, la desviación estándar (DE) y el valor de corte para esta técnica en UA/mL.

En la Tabla 5 se representa las densidades ópticas y las unidades arbitrarias por mililitros de cada animal. Además, se incluyen el promedio, la desviación estándar y el valor de corte. Este parámetro se definió como el promedio de los valores de UA/mL del control negativo más dos desviaciones estándar. Para este ensayo, el valor de corte fue 18,086 UA/mL correspondiente a un valor de densidad óptica de 0,325. Este valor permite discriminar entre los animales respondedores de los no respondedores, por lo que cualquier animal que genere un valor de respuesta mayor a 18,086 UA/mL se considera un animal respondedor.

En la Figura 7 se muestran las medias de las concentraciones calculadas para el grupo experimental y los controles en UA/mL. Las DE de cada grupo se muestran como barras de error.

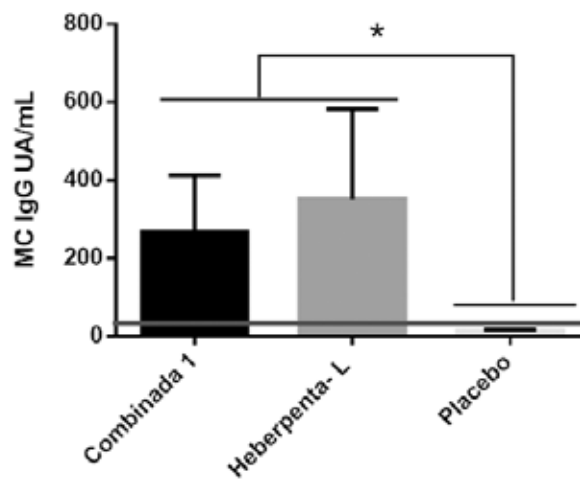


Figura 7. Se observan las medias de las concentraciones (MC) de los sueros procedentes del ensayo de inmunogenicidad. Las barras de error corresponden a las DE calculadas. La línea horizontal representa el valor de corte establecido para esta técnica.

Como se puede apreciar en la figura 7 no existieron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre las respuestas generadas por el candidato experimental combinado con respecto a la vacuna Heberpenta-L (control positivo), pero sí con el grupo placebo. Además, ambas vacunas generaron concentraciones de anticuerpos muy superiores al valor de corte establecido para este ensayo. En el caso de la vacuna combinada, se generó una respuesta de IgG de 267,89 UA/mL y la vacuna Heberpenta-L indujo niveles de 351,62 UA/mL. La formulación del grupo control negativo, por otro lado, no indujo respuesta de anticuerpos contra el HBsAg.

Estos resultados avalan el empleo del ELISA en la cuantificación de anticuerpos IgG anti-HBsAg para la evaluación de la inmunogenicidad de nuevos candidatos vacunales que posean este antígeno en su formulación.

Conclusiones

El ELISA de cuantificación que se desarrolló es preciso y específico. Este cumple con los parámetros necesarios que demuestran su aplicabilidad para la evaluación de la respuesta humoral generada por el HBsAg en sueros de conejos. Además, se obtuvo un estándar interno para la construcción de la curva de calibración, lo que nos permitió cuantificar los niveles de anticuerpos IgG (UA/mL) contra el HBsAg.

Agradecimientos.

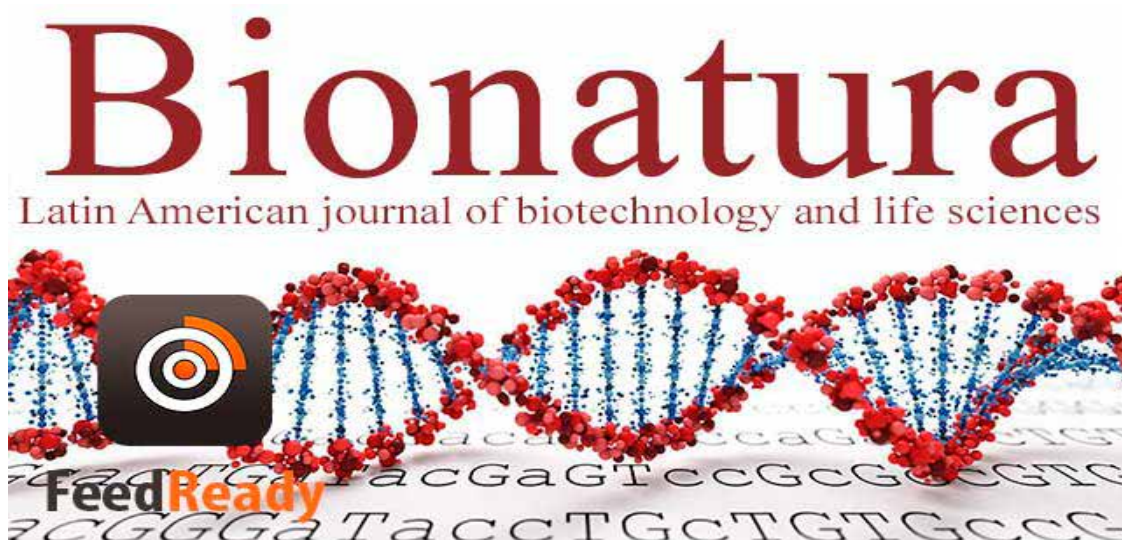
Agradecemos al Profesor Rolando Ochoa por la detallada revisión del tema y sus sugerencias que contribuyeron en la realización y mejoramiento de este trabajo.

Referencias bibliográficas

- Alonso R, Aguilera A, Córdoba J, Fuertes A. Diagnóstico microbiológico de las hepatitis virales. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(9):e53–e62.
- Trépo C, Chan HLY, Lok A. Hepatitis B virus infection *Lancet.* 2014;384:2053–63.
- Ioshimoto LM, Rissato ML, Bonilha VSJ, Miyaki C, Raw I, Granovski N. Safety and immunogenicity of hepatitis b vaccine butang in adults. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 1999;41(3):191–3.
- Leyva A, Sánchez JC, López L, Font M, González T, Pérez B, et al. Desarrollo, validación y aplicación de un nuevo ELISA para el control del proceso del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B recombinante. *Biotecnología Aplicada* 2011;Vol.28, No.4:221–7.
- Aguilar JC. Efecto adyuvante de los antígenos de la superficie y la nucleocápsida del virus de la hepatitis B y su utilidad en el desarrollo de candidatos vacunales [Doctorado]: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. División de Vacunas; 2007.
- WHO. Recommendations to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Recombinant Hepatitis B Vaccines. WHO Technical Report Series. 2010 (Proposed replacement of: TRS 786, Annex 2 and TRS 889, Annex 4).
- Aristegui J, Usonis V, Coovadia H, Riedemann S, Win K, Gatchalian S, et al. Facilitating the WHO expanded program of immunization: the clinical profile of a combined diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B and Haemophilus influenzae type b vaccine. *Int J Infect Dis* 2003;7:143–51.
- OMS. Vacunas contra la hepatitis B. Documento de posición de la OMS. www.who.int/immunization/wer7928HepB_July04_position_paper_SP.pdf. 2004.
- Directive 2010/63/eu of the european parliament and of the council on the protection of animals used for scientific purposes. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32010L0063>. 2010.
- Ulloa M, Crus B, Guilarte E, Fernández T, Escalona L. Purificación de IgG de conejo por cromatografía de Intercambio iónico y afinidad. *Cocmed.* 2003;7(1).
- Mandiarote A, Gutiérrez N, Valmaseda T, Sosa R, Ontivero I, Talavera A, et al. Estandarización de ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para la cuantificación de anticuerpos IgG inducidos por una vacuna de vesículas de membrana externa de los serogrupos A y W135 de Neisseria meningitidis. *VacciMonitor.* 2012;21(2):16–23.
- Espinosa-Viñals C, Soroa-Millán Y, Martín-García Y, Pérez-Baños A, Nicot-Valenciano M, Rodríguez-Noda L, et al. Validación y aplicación de un ELISA para la cuantificación de anticuerpos IgG contra polisacárido capsular Vi de Salmonella Typhi *VacciMonitor.* 2015;24(1):21–32.
- Plikaytis B, Carlone G. Program ELISA for Windows User's Manual, version 2. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta: CDC. 2005.
- Izquierdo M, Vega JL, Cortés MdlÁ, Expósito N, Vega M, Rodríguez O, et al. Comportamiento inmunológico del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B como componente de una vacuna combinada DPTc-HB. *Biotecnología Aplicada.* 2000;Vol.17, No.2:112–4.
- Asensi F, Otero MC, Pérez D, Miguel MJS. Protección frente a hepatitis B en vacunas combinadas. *An Pediatr* 2003;58(5):27–32.
- Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, Estrada E, García AM, Blanco R, et al. Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *VacciMonitor.* 2000;9 No. 3.
- Protein Purification Handbook: GE Healthcare Bio-Sciences AB; 2007.
- Rodríguez CV, Martínez G, Torres B, Zúñiga Y, Alles A, Martínez A. Estandarización y validación de un ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero humano. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* 2013;12(4):534–41.

Recibido: 23 agosto 2017

Aprobado: 11 noviembre 2017



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

RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas aisladas de invertebrados marinos de la costa del Chubut (Patagonia – Argentina)

Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from marine invertebrates of Chubut coast (Patagonia – Argentina)

Parada Romina¹, Beraud Lucas², Andoro Débora¹, Sosa Franco¹, Marguet Emilio¹ y Vallejo Marisol^{1*}.

DOI. 10.21931/RB/2017.02.04.8

RESUMEN

Se estudió la actividad antagonista de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de invertebrados marinos de la costa del Chubut. Dentro de los 92 aislamientos, 22 exhibieron actividad, de las cuales 3 cepas se clasificaron como *Lactobacillus* y 19 como *Enterococcus*. En todos los casos, después de la neutralización con NaOH y tratamiento térmico, la actividad inhibitoria del sobrenadante libre de células de las cepas estudiadas permaneció activa. El tratamiento con lisozima y catalasa no afectó la actividad antimicrobiana; sin embargo la actividad enzimática de la tripsina abolió la acción inhibitoria de los sobrenadantes, confirmando la naturaleza proteica de los compuestos activos. Las actividades contra *Listeria innocua* ATCC 33090 logradas por cepas de *Enterococcus* variaron entre 640 y 163.840 unidades arbitrarias/mililitro (AU/ml), mientras que las cepas de *Lactobacillus* exhibieron actividades entre 20 y 40 AU/ml. Las cepas *E. mundtii* 278Pe, *E. hirae* 463Me y *E. hirae* 471Me exhibieron las actividades inhibitorias más altas contra un amplio espectro de bacterias patógenas y/o contaminantes de alimentos. A pesar de la amplia información disponible sobre estos microorganismos, existen pocos estudios de BAL aisladas a partir de invertebrados de origen marino. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que esta fuente puede contribuir al hallazgo de nuevas bacteriocinas con potencial uso en la industria alimentaria.

Palabras Clave: Bacteriocinas, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, Patagonia

ABSTRACT

The antagonist activity of lactic acid bacteria (LAB) strains isolated from marine invertebrates of Chubut coast was studied. Among the 92 isolates, 22 displayed activity: 3 strains were classified as *Lactobacillus* and 19 as *Enterococcus*. In all cases, after neutralization with NaOH and heat treatment the inhibitory activity of cell free supernatant of the strains studied remained active. Treatment with lysozyme and catalase did not affect the antimicrobial activity; however enzymatic activity of trypsin abolished the inhibitory action of the supernatants, confirming the proteinaceous nature of the active compounds. The activities against *Listeria innocua* ATCC 33090 achieved by *Enterococcus* strains ranged between 640 and 163.840 arbitrary units/milliliter (AU/ml), while *Lactobacillus* strains displayed activities between 20 and 40 AU/ml. The strains *E. mundtii* 278Pe, *E. hirae* 463Me and *E. hirae* 471Me exhibited the highest inhibitory activities against a wide spectrum of pathogenic bacteria and/or food contaminants. In spite of extensive available information about these microorganisms, there are few studies of LAB from invertebrates of marine origin. The results obtained in this study suggest that this source may contribute to the finding of novel bacteriocin like substances with potential use in food industry.

Keywords: Bacteriocins, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, Patagonia

Introducción

El medio marino es un reservorio excepcional, alberga una gran variedad de organismos con potencial para producir diversos productos naturales con propiedades bioactivas como antibacterianos, antifúngicos, antivirales, entre otros. En la actualidad, tanto el interés académico como industrial se concentra en microorganismos, en parte debido al creciente número de metabolitos biológicamente activos reportados en bacterias marinas, específicamente en bacterias ácido lácticas (BAL)⁽¹⁾.

Las BAL constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos Gram positivos, que producen ácido láctico como principal metabolito durante el proceso de fermentación. No obstante, sus altos requerimientos nutricionales, se han adaptado para crecer

en condiciones ambientales muy diferentes y están ampliamente extendidas en la naturaleza⁽²⁾. Las BAL presentan gran potencial biotecnológico, son capaces de producir metabolitos con actividad antimicrobiana que exhiben mecanismos inespecíficos (diacetilo, ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno) o específicos como el caso de las bacteriocinas. Las bacteriocinas son moléculas antimicrobianas de naturaleza peptídica, con un origen genético diverso, suelen presentar modificaciones postraduccionales y pueden funcionar como una estrategia competitiva contra otros microorganismos⁽³⁾.

El ambiente marino de la Argentina presenta una gran extensión, como así también una alta productividad biológica y biodiversidad de macro y microorganismos. A pesar de presentar un gran potencial para aplicaciones biotecnológicas,

¹ Laboratorio de Biotecnología Bacteriana, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud (Sede Trelew), Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco - Argentina.

² Institut Universitaire de Technologie de La Rochelle – Francia.

E-mail de correspondencia: *soltrelew@gmail.com

los microorganismos que habitan estos ecosistemas permanecen mayormente inexplorados y sus propiedades aún no explotadas⁽⁴⁾.

En el presente trabajo se describe la capacidad inhibitoria de cepas de BAL productoras de sustancias antimicrobianas contra microorganismos Gram positivos y negativos, aisladas de invertebrados marinos de la provincia del Chubut (Patagonia-Argentina). Además, se describen las principales características fisicoquímicas de los metabolitos bioactivos.

Materiales y Métodos

Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Se tomaron muestras asepticamente del contenido intestinal de mejillón patagónico (*Mytilus edulis platensis*), caracol (*Adelomelon ancilla*), navaja (*Solen tehuelchus*), almeja rayada (*Ameghinomya antiqua*), vieira tehuelche (*Aequipecten tehuelchus*) y papa de mar (*Polychinidae*) de las localidades de Puerto Lobos, Puerto Madryn, Playa Unión, Camarones, Comodoro Rivadavia y Rada Tilly, pertenecientes a la provincia del Chubut, Argentina. Las muestras se trasladaron a 4° C hasta el laboratorio y se procesaron dentro de las 8 -10 h. El enriquecimiento primario se realizó en caldo de Man, Rogosa & Sharp (MRS), MRS ajustado a pH 4,6 y 5,4; MRS con NaCl al 8 %, caldo M17 y caldo de púrpura bromo-cresol azida. Los enriquecimientos se incubaron a 30 °C durante 24-48 h. Luego del período de incubación los cultivos líquidos se repicaron a agar MRS respetando la misma composición que su respectivo medio de enriquecimiento, agar M17 y agar bilis-esculina. Todos los medios sólidos se suplementaron con ácido nalidixico (20 µg/mL) y nistatina (10 µg/mL) y se incubaron durante 24-72 h a 30 °C. Se realizaron repiques hasta obtener cultivos puros que se conservaron a -30 °C en el Ceparío del Laboratorio de Biotecnología Bacteriana como parte de la colección.

Identificación fenotípica

Las colonias sospechosas se sometieron a las siguientes pruebas bioquímicas: coloración de Gram, catalasa, oxidasa, fermentación de azúcares, producción de pigmento, crecimiento en NaCl (6,5 y 8 %), actividad de pirrolidonil aminopeptidasa y producción de gas (CO₂) a partir de glucosa.

Ensayos antimicrobianos de los sobrenadantes

Las cepas de BAL se cultivaron en caldo MRS a 30 °C hasta alcanzar la fase estacionaria (12-16 h). Luego del período de incubación los medios se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 min. Los sobrenadantes libre de células (SLC) se emplearon en el ensayo antimicrobiano que se realizó por el método de difusión en placa según la metodología descrita por Vallejo y col.⁽⁵⁾ Los microorganismos utilizados como indicadores se encuentran listados en la Tabla 1.

Influencia de la temperatura y tratamientos enzimáticos sobre la actividad antimicrobiana

Los SLC de las cepas de BAL se trataron con NaOH 0,5 M hasta alcanzar la neutralidad. Los sobrenadantes neutralizados se sometieron posteriormente a una temperatura de 80 °C (5 min) y 100 °C durante 5, 15 y 30 min. La sensibilidad a enzimas se llevó a cabo, determinando la actividad residual luego de tratar los SLC durante 2 h con tripsina, lisozima y catalasa (5 mg/mL) en las condiciones óptimas para cada enzima. En todos los ensayos la actividad residual se determinó por el procedimiento previamente descrito.

Título de la actividad inhibitoria

La determinación cuantitativa de la actividad se realizó por el método de difusión en placa mediante la dilución seriada de los SLC según lo descrito anteriormente⁽⁵⁾, utilizando como

microorganismo indicador a *Listeria innocua* ATCC 33090. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias/ml. Las unidades arbitrarias (UA) equivalen a la inversa de la mayor dilución con actividad antimicrobiana (halo de inhibición), dividido por los mililitros de sobrenadante sembrados (UA=1/dilución/ml sembrados).

Resultados y Discusión

De las muestras procesadas de invertebrados marinos se lograron aislar y clasificar mediante identificación fenotípica 92 cepas de BAL pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Enterococcus*. Del total de microorganismos aislados, 3 cepas correspondientes al género *Lactobacillus* sp. y 19 *Enterococcus* exhibieron actividad inhibitoria contra uno o más de los microorganismos utilizados como indicadores (Tabla 1). La mayor actividad se presentó contra cepas del género *Listeria* y otras BAL, mientras que no se obtuvo inhibición contra bacterias Gram negativas, salvo la especie de *Vibrio anguillarum*. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en trabajos previos con BAL provenientes del medio marino^(1, 6, 7, 8).

La distribución de especies de enterococos encontrada en este estudio es comparable con los resultados expuestos en trabajos previos en cepas de la región, en los cuales *E. faecalis* y *E. faecium* fueron las especies predominantes en alimentos y animales⁽⁹⁾. En este trabajo, además de las especies antes mencionadas se aislaron cepas de *E. hirae*, *E. mundtii* y *E. columbae* proveniente de mejillón patagónico, pepino de mar y navaja respectivamente.

En el presente estudio, la alta frecuencia de aislamientos de BAL sugiere que, no obstante los complejos requerimientos nutricionales exigidos por estos microorganismos, exhiben una alta adaptabilidad a un variado número de ambientes incluyendo, como en este caso, al medio marino. Estos resultados, como en anteriores realizados en peces de la costa noreste del Chubut⁽⁵⁾ y del estuario de Bahía Blanca⁽¹⁰⁾ confirman la presencia de BAL productoras de sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas (SITB). Sin embargo, existen escasos reportes de BAL productoras de antimicrobianos provenientes de invertebrados marinos⁽¹¹⁾, menos aún en la zona marítima patagónica, lo que resulta un nicho ecológico escasamente estudiado y con gran potencial biotecnológico.

Luego de tratar los SLC de las cepas seleccionadas con NaOH hasta alcanzar la neutralidad, el efecto inhibitorio no exhibió modificaciones. Los mismos resultados se obtuvieron cuando los sobrenadantes neutralizados se sometieron a los tratamientos térmicos. El tratamiento enzimático llevado a cabo con catalasa y lisozima no alteró la actividad antagonista ejercida por los sobrenadantes de las 22 cepas seleccionadas, en cambio el tratamiento con tripsina abolió por completo la capacidad inhibitoria. Estos resultados confirman que la actividad antimicrobiana del principio activo no es ejercida por el peróxido de hidrógeno, su naturaleza proteica y la ausencia de azúcares en su estructura, características compatibles con SITB. En todos los casos estudiados, la estabilidad térmica de estas moléculas indicaría que se trata de péptidos de bajo peso molecular con actividad antilisteria, propiedades que permiten incluirlas dentro del grupo de bacteriocinas clase I o II⁽³⁾.

Los títulos de la actividad antagonica contra *L. innocua* ATCC 33090 resultaron variables. Las cepas de *Enterococcus* lograron actividades comprendidas entre 640-163.840 UA/ml, mientras que las 3 cepas de *Lactobacillus* presentaron títulos inferiores (20-40 UA/ml). Estos resultados, como en trabajos previos^(6, 8) demuestran el potencial antimicrobiano de las cepas de enterococos, rasgo distintivo en este género de BAL. Las cepas de *E. mundtii* (278 Pe) y *E. hirae* (463 Me y 471 Me) exhibieron la mayor actividad antagonica, un espectro inhibitorio contra cepas patógenas y/o contaminantes de alimentos Gram positivas y negativas, resultados prometedores si tenemos en cuenta que las mencionadas especies son poco frecuente en este tipo de hábitat.

Cepas Seleccionadas

Cepas	E. fm	Lb.	E.	Lb.	Lb.	E. fl.	E. fl.	E. fl.	E. co	E. mu	E. fm	E. fm	E. fm	E. lu	E. lu	E. fm	E. fm	E. fm	E. fm			
Indicadoras:	47 VT	48 Na	49 Me	68 Na	69 Na	75 Me	77 Me	78 Me	87 Na	278 Pe	397 Na	432 Me	433 Me	456 Me	459 Me	463 Me	468 Me	471 Me	478 Me	479 Me	535 Ca	
<i>Listeria innocua</i> Tw 67	++	+	-	+	+	+	+	+	+	+++	+	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	++	++	+	++	+	-	-	-	+	++	+	++	+	++	++	++	++	++	++	++	+	+
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	++	++	++	++	+++	-	-	-	+++	+++	+	+++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++
<i>L. monocytogenes</i> 1908 ^a	++	++	-	++	-	-	-	-	++	+++	+	++	+	+	++	++	++	++	++	++	+	+
<i>L. monocytogenes</i> 1915 ^a	++	++	-	+	-	-	-	-	++	+++	+	++	+	+	++	++	++	++	++	++	+	+
<i>L. monocytogenes</i> 1599 ^a	++	+	-	+	-	-	-	-	++	+++	+	++	+	++	++	++	++	++	++	++	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	+	+	++	+	++	-	-	-	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus</i> Van A	+	+	+	+	+	-	-	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus</i> Van B	+	+	+	+	-	-	-	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
<i>Enterococcus</i> Van C	+	+	+	+	-	-	-	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. casseliflavus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+++	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lc. gariviose</i> 03-8460 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lc. gariviose</i> 03-8702 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lc. pitchum</i> 23.3.92 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus molar</i> MT 2576 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> TwLb 5	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 5923	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aerococcus latus</i> ATCC 15307	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 35218	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia ruckeri</i> 02/1607C ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fibrio anguillarum</i> V10 ^b	+	++	-	++	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+

Tabla 1: Actividad antimicrobiana de las cepas seleccionadas contra bacterias Gram positivas y Gram negativas

Halo de inhibición: +, ≥ 15 mm; ++, ≥ 15 mm; +++, ≥ 20 mm; -, sin inhibiciónE.fm: *Enterococcus faecium*; E. fl: *E. faecalis*; E. co: *E. columbae*; E. mu: *E. mundtii*; E. hi: *E. hirae*; Lb: *Lactobacillus* sp.

VT: vieira tehuelche; Na: navaja; Me: mejillón; Pe: papa de mar; Ca: caracol

^a Cepas provistas por el Dr. Fernandez-Garayzabal (Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid)^b Cepas provistas por el Lic. Ledesma (Fac. de Cs. Naturales y Cs. de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco)

A diferencia de otras BAL, el género *Enterococcus* no es considerado un organismo GRAS (microorganismos reconocidos como seguros), aunque algunas especies se utilizan como probióticos para humanos y animales⁽¹²⁾. En consecuencia, se hace indispensable completar los estudios de potenciales factores de virulencia y/o rasgos negativos en las cepas de enterococos bacteriocinogénicas para futuras aplicaciones en la biopreservación de alimentos.

Conclusiones

La mayor parte de la investigación sobre BAL se ha direccionado a cepas de origen terrestre, específicamente relacionadas con la industria láctea y sus derivados. Sólo unos pocos estudios se han centrado en el aislamiento en este grupo bacteriano a partir de invertebrados marinos y en la búsqueda de su capacidad para producir bacteriocinas. Las cepas de BAL estudiadas en este trabajo, específicamente las especies de *Enterococcus* son productoras de SITB que podrían resultar efectivas para el control de biológico de bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. José Francisco Fernández-Garayzábal y al Lic. Pablo Ledesma por suministrar las cepas indicadoras. Este trabajo fue financiado con fondos otorgados por la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco al proyecto “Potencial biotecnológico de enterococos aislados del medio marino patagónico”.

Referencias bibliográficas

- Desriac F, Defer D, Bourgougnon N, Brillet B, Le Chevalier P & Fleury Y. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Marine Drugs*. 2010; 8: 1153-1177.
- Buntin N, Chanthachum S & Hongpattarakere T. Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. *Songklanakarin Journal Science Technology*. 2008; 30(1): 141-148.
- Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D & Kuipers OP. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2016; 100:2939-2951.
- Dionisi HM, Lozada M & Olivera NL. Bioprospection of marine microorganisms: potential and challenges for Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 2012; 44:122-132.
- Vallejo M, Olivera NL, Sequeiros C & Marguet E. Actividad antilisteria de bacterias ácido lácticas aisladas de peces marinos. *Analecta Veterinaria*. 2009; 29(2): 5-9.
- Migaw S, Ghrairi T, Le Chevalier P, Brillet B, Fleury Y & Hani K. Isolation and characterization of *Enterococci* bacteriocin strains from tunisian fish viscera. *Food and Nutrition Sciences*. 2013; 4:701-708.
- Shubhankar Ghosh A, Selvam DG, Neethu CS, Saramma AV & Hatha AAM. Diversity and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from the gut of marine fish *Rastrelliger kanagurta* against fish, shrimp and human pathogens. *Journal of the Marine Biological Association of India*. 2013; 55(2): 22-27.cl
- Ghomrassi H, Braiek O, Choiset Y, Haertlé T, Hani K, Chobert JM & Ghrairi T. Evaluation of marine bacteriocinogenic enterococci strains with inhibitory activity against fish-pathogenic Gram-negative bacteria. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2016; 118: 31-43.
- Vallejo M, Ledesma P, Ibañez C, Aguirre L F, Parada RB, Vallejo BB & Marguet ER. Resistencia a metales pesados, antibióticos y factores de virulencia en cepas de *Enterococcus* aisladas en la provincia del Chubut, Argentina. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2016; 36:16-22.
- Sica MG, Olivera NL, Brugnoli LI, Marucci PJ, López Cazorla AC & Cubitto MA. Isolation, identification and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from the Bahía Blanca Estuary. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 2010; 45(3): 389-397.
- Nguyen VD, Pham T, Nguyen TH, Nguyen TT & Lone H. Screening of marine bacteria with bacteriocin-like activities and probiotic potential for ornate spiny lobster (*Panulirus ornatus*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology*. 2014; 40:49-60.
- Ferreira Araujo T & de Lucis Fortes Ferreira CL. The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2013; 56:457-66.

Recibido: 25 agosto 2017

Aprobado: 5 noviembre 2017

REPORTE DE CASOS / CASE REPORTS

Enfermedad de Paget Extramamaria en varón. A propósito de un caso

Paget's disease Extramammary in male. About a case

Adrian Isacc Nieto Jiménez¹, Lourdes Gladys Rodríguez Ramírez², Karina Benítez Escobar³

DOI.10.21931/RB/2017.02.04.9

RESUMEN

Se presenta el caso de un paciente ecuatoriano de 72 años valorado en el hospital provincial de Ibarra, Imbabura por presentar lesiones genitales de 8 años de evolución. Valorado anteriormente en el año 2016 con varios planteamientos diagnósticos dentro de los que se incluyó el linfoma cutáneo y la enfermedad de paget extra mamaria, esta última muy rara. Se realiza biopsia cutánea y se concluye como enfermedad de paget extramamaria. Esta entidad constituye una neoplasia cutánea infrecuente. Se trata de un adenocarcinoma intraepitelial que se presenta en áreas ricas en glándulas apocrinas. La mayoría de las veces se localiza en la vulva, seguida en orden de frecuencia por el escroto, la región perianal y la axila. Este trabajo ilustra una forma de presentación poco frecuente de esta dermatosis en el sexo masculino con un diagnóstico tardío cuyo pronóstico es reservado.

Palabras claves: Enfermedad de paget extramamaria, pronóstico.

ABSTRACT

We present the case of a 72-year-old Ecuadorian patient evaluated in the provincial hospital of Ibarra, Imbabura for presenting genital lesions of 8 years of evolution. Previously evaluated in 2016 with several diagnostic approaches including cutaneous lymphoma and extramammary paget disease, the latter very rare. A skin biopsy is performed and is concluded as an extramammary paget disease. Extramammary Paget's disease is an uncommon cutaneous neoplasm. An intraepithelial adenocarcinoma occurs in areas rich in apocrine glands. Most of the time it is located in the vulva, followed in order of frequency by the scrotum, the perianal region and the axilla. This work illustrates a rare form of presentation of this entity in males with a late diagnosis whose prognosis is reserved.

Key words: Paget's disease, extramammary, prognosis.

Introducción

La Enfermedad de Paget Extramamaria (EPEM) constituye un tumor cutáneo que se localiza en zonas anogenitales y axilares, sin embargo, se han descrito casos de lesiones ubicadas en la cara y los muslos. La discusión sobre su origen, intraepidérmico o como resultado de metástasis epidérmicas de un tumor subyacente, aún sigue viva.¹ Es una enfermedad muy infrecuente, con predominio de 3:1 a favor de la mujer. Raro en el sexo masculino. La mayoría de las veces la EPEM se localiza en la vulva, seguida en orden de frecuencia por el escroto, la región perianal y la axila. Exige un estudio de extensión debido a su asociación con neoplasias malignas en otras localizaciones.²

A pesar de compartir características clínicas e histológicas con la enfermedad de Paget mamaria, es reconocida actualmente como una entidad diferente y única. En 12 % a 33 % de casos es posible encontrar un tumor maligno subyacente, donde el riesgo es más alto si se trata de un Paget perianal.¹⁶ Además, la localización del tumor maligno subyacente tiende a relacionarse con la localización de la lesión pagetoide.³

El comienzo de la EPEM es lento, insidioso existiendo, habitualmente, prurito. Clínicamente se manifiesta como una placa eritemato-descamativa, erosionada y exudativa que al desecarse motiva costras. Bordes geográficos y bien delimitados. En definitiva, recuerda a un eczema. Clínicamente es posible distinguir entre estas lesiones y los trastornos por liqueniación.^{1,4}

Tanto en la enfermedad de Paget mamaria como extramamaria el patrón de disposición de las células neoplásicas en la epidermis es característico (patrón pagetoide) y consiste en la infiltración de las distintas capas de la epidermis, generalmente de forma más intensa en las más bajas, por células de citoplasma amplio y claro, a veces eosinofílico, conteniendo núcleos vesiculares.⁵

El tratamiento de elección de la EPEM sigue siendo la escisión quirúrgica o la microcirugía de Mohs, aunque se discuten otras alternativas actualmente.⁶

En general, el pronóstico de la enfermedad primaria es favorable, aunque el resultado puede variar según ciertos factores de mal pronóstico como la duración prolongada de la enfermedad, la avanzada edad, el crecimiento invasivo y la profundidad de invasión.^{5,6}

En EU se registran tasas de prevalencia de 1 por cada 1 millón de habitantes, predominando en el sexo femenino y en localizaciones genitales en ambos sexos. La edad de comienzo promedio es en la quinta década de vida.

En América del sur no se reportan casos en el sexo masculino.⁷ Se estima que existe un subregistro por el diagnóstico tardío planteado dado por la similitud con otras entidades y la baja frecuencia de presentación.^{3,7}

¹ Especialista en primer Grado en Medicina General Integral y Dermatología. Diplomado en Hematodermias. Profesor Asistente. Investigador Agregado.

² Especialista en primer grado en Medicina General Integral y Anatomía Patológica. Profesor Asistente.

³ Especialista en Anatomía Patológica. Hospital IIES San Francisco de Quito.

Instituto Ecuatoriano de Seguro Social. Hospital Ibarra. Imbabura.

E-mail de correspondencia: adrianisacnj@gmail.com

Caso Clínico

Se trata de un paciente m,b de 72 años de edad que presentaba lesiones eritemato ulcerativas en área genital de 8 años de evolución. Tratado en varias ocasiones sin mejoría clínica evidente. Es valorado en diciembre 2016 y se plantean varios diagnósticos luego de revisar la literatura incluyendo la Enfermedad de Paget extra mamaria.

Al interrogatorio, refirió como antecedente hipertensión arterial e hipotiroidismo de 6 años en tratamiento médico con losartán y levotiroxina, 50 mg y 75 mg respectivamente. Ningún otro dato de interés.

El cuadro cutáneo inició con áreas ulcerativas y eczematosas en regiones inguinoescrotales que fue interpretado inicialmente como una dermatitis de contacto o una psoriasis invertida. Utilizaron cremas esteroideas tópicas de alta potencia y antibioticoterapia, pero solo presentó mejoría parcial. Las lesiones se extendieron y se tornaron más eritematosas y dolorosas. A la exploración física se observó una dermatosis inguinoescrotal con exulceraciones y dos nódulos pequeños, bilaterales y simétricos de 8 años de evolución. La afectación era más marcada en el escroto y se acompañó de maculas pigmentadas, dolor a la palpación y secreción blanco amarillenta. Además, piel seca y algunas costras superficiales. (Figuras 1 y 2)



Figura 1. Nótese el aspecto eritematoso y costroso con pigmentación no homogénea.



Figura 2. Aquí se observa marcada exulceración en la base del pene y escroto.

Se procedió a tomar muestra y el estudio histopatológico mostró epidermis comprometida por neoplasia compuesta por células de citoplasma amplio, claro, abundante. Núcleos grandes vesiculares. Se observan mitosis atípicas. Se extiende a dermis y glándulas subyacentes. (Figuras 3). Inmunohistoquímica: Permite la diferenciación entre primaria y secundaria.

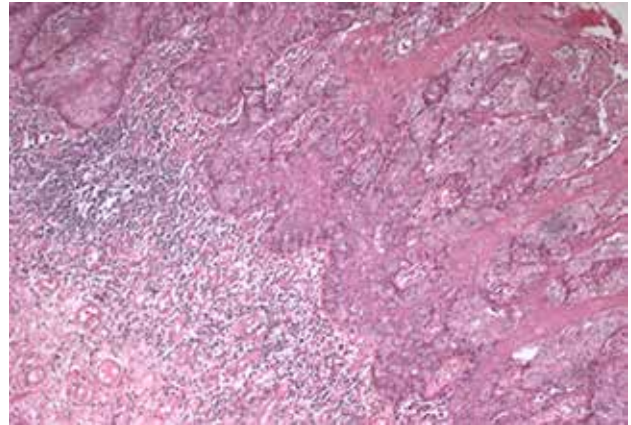


Figura 3. Histopatología. Tinción con hematoxilina eosina donde se aprecia epidermis comprometida por neoplasia compuesta por células de citoplasma amplio, claro, abundante. Se observan las células de Paget.

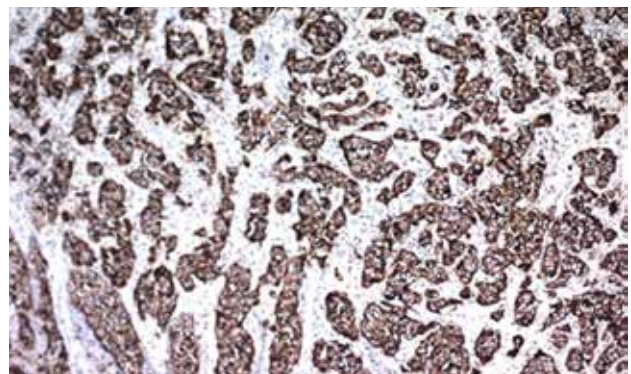


Figura 4. Marcadores Inmunohistoquímicos en la EPDM: CEA Y Citoqueratina 7 . (CEA) Positivo en citoplasma de células de la lesión en la EPDM.

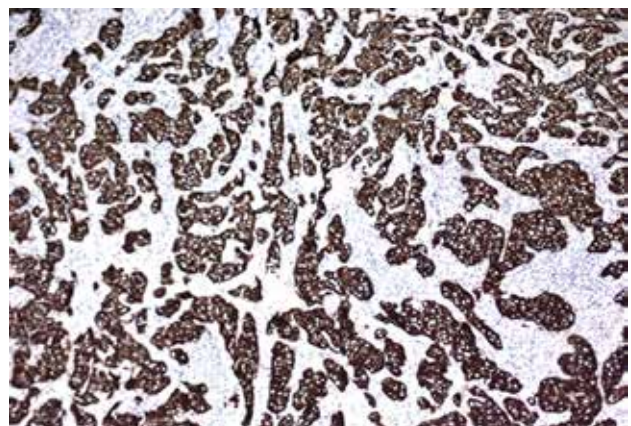


Figura 5. Citoqueratina 7 fuertemente positivo en citoplasma de las células de la lesión que tiñe las células de Paget. Tiene un 90 % de especificidad en la EPDM.

Las muestras resultaron HMB45 negativo y la S100: negativo en células de la lesión. El diagnóstico es compatible con Enfermedad de Paget Extramamaria primaria. El diagnóstico correcto lo da la arquitectura celular e inmunohistoquímica. Se realizaron exámenes complementarios de rutina, eco abdominal y Rx de tórax que fueron normales. Hasta el momento no se encontró metástasis sistémica u otra alteración cutánea.

El paciente fue referido al servicio de oncología para su estadiaje y tratamiento adecuado. Hoy se mantiene estable aun en tratamiento médico.

Al tener en cuenta que se trata de una enfermedad de escasa casuística y del hecho de la existencia de disparidad de criterios en cuanto a conducta terapéutica, se consideró justa la publicación de un nuevo caso.

Comentarios

En 1874 el doctor James Paget describió por primera vez la enfermedad de Paget de la mama.¹ Desde entonces se han reportado casos de localización extra-mamaria, el primero de los cuales lo realizó Crocker en 1888, en el escroto.² Se han descrito, además, otras localizaciones como son: región axilar,³ perineal y perianal,^{4,5} broncopulmonar, uretra, párpados,⁶ esófago y vulva.⁸

El primer caso de Enfermedad de Paget extramamaria, descrito por Crocker en 1889, se trataba de un varón con lesión en área genital.⁶ La forma primaria de la EPEM consiste en adenocarcinomas de diferenciación apocrina que pueden metastatizar por vía sanguínea o linfática; y la secundaria es la consecuencia de la diseminación dérmica de un tumor próximo o a distancia.^{1,3}

La enfermedad de Paget inguino escrotal constituye una entidad rara, incluso con incidencia baja en clínicas especializadas. En la literatura mundial se han reportado alrededor de 120 a 150 casos, sin embargo, solo algo más de 50 pacientes han sido debidamente documentados sobre todo en EU.⁵

Al igual que en otros casos reportados en la literatura mundial,^{7,9} el diagnóstico fue tardío (a los 8 años del inicio clínico del proceso patológico), confundiendo con otras entidades clinicohistológicas como la enfermedad de Bowen, linfomas cutáneos de células T epidermotrópicas, el melanoma y la eritroplasia de Queyrat, que constituyen diagnósticos diferenciales.⁸

A diferencia de la enfermedad de Paget de la mama en la que la mayoría de los casos se acompaña de un tumor subyacente (carcinoma ductal), las lesiones genitales y las vulvares generalmente se encuentran limitadas a la epidermis, folículos pilosos y glándulas sudoríparas.¹⁰

En Ecuador no existen reportes de casos de pacientes del sexo masculino con EPEM. Solo se ha descrito en mujeres entre 50 y 70 años de edad a nivel bulbar y perianal.¹¹

En lo que al tratamiento se refiere, existen controversias. La cirugía es la primera opción terapéutica. Aunque se realice una extirpación amplia, el índice de recurrencia puede alcanzar el 25%, que se puede reducir al 10% si se realiza una cirugía micrográfica de Mohs, dado que en este tipo de cirugía se evalúan cuidadosamente los márgenes operatorios.⁶

Algunos autores señalan buenos resultados con radioterapia o la combinación de ésta con la cirugía. Otros señalan la combinación de quimioterapia más radioterapia.¹²

El pronóstico de la enfermedad extra-mamaria es ambiguo, pues a pesar del relativo bajo grado de malignidad de estas lesiones, en un elevado número de casos se asocia a otros tumores malignos, en ocasiones difíciles de localizar además de la tendencia a la recidiva elevada pasando incluso el período considerado de curación estándar de 5 años. Un mal pronóstico se asocia a la existencia de un carcinoma infiltrante, pero si se limita a

la afectación intradérmica puede persistir muchos años sin desarrollar diseminación, aunque en casos de no tratarse pueden llegar a hacerse infiltrante.^{10,13} La EPEM es una enfermedad infra diagnosticada por su baja incidencia y la variedad de entidades con clínica similar.^{3,10}

Conclusiones

La EPEM representa una rara entidad en el sexo masculino. Es más frecuente en mujeres entre 50 y 70 años de edad. Por su semejanza con otras dermatosis predomina el diagnóstico es tardío. Su pronóstico depende del tiempo de evolución y la edad del paciente.

Recomendaciones

Ante cualquier dermatosis crónica en región inguinal o axilar de aspecto eccematoso y prurito persistente, que no se resuelve después de seis semanas, se debe realizar una biopsia de la lesión para estudio anatomopatológico.

Referencias bibliográficas

- Sánchez-Sánchez JM, Molinero-Caturla, JA, Ferreres-Riera JR et al. Enfermedad de Paget extramamaria. *Semergen*, 2014; 37(9):504-7.
- Martín González B, Pitarch Bort G. La enfermedad de Paget extramamaria. *Piel*, 2013; 21(7):332-5.
- Thompson I, Thrasher JB, Aus G, Burnett AL, Canby-Hagino ED, Cookson MS, et al. Guideline for the management of clinically localized prostate cancer. *J Urol*. 2015; 177:2106-31.
- Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part I: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *Actas Urol Esp*. 2016; 35:501-14.
- Mohler J, Bahnsen RR, Boston B, Busby JE, D'Amico A, Eastham JA, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: Prostate cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2016; 8:162-200.
- Martorell A, Sanmartín O, Escutia B, Guillén C. Imiquimod tópico al 5% como alternativa terapéutica en la enfermedad de Paget extramamaria primaria. *Piel*. 2016; 24:568-71.
- Ligia Aranibar, JA, Ramírez C. Enfermedad de Paget, diferentes formas de una misma enfermedad. *Estadísticas. Piel* 2016; 27:178-81.
- Crocker HR. Paget's disease affecting the scrotum and penis. *Trans Pahal Soc Lond*. 2017; 40: 187-91.
- Ligia Aranibar, JA, Ramírez C. Enfermedad de Paget, diferentes formas de una misma enfermedad. *Estadísticas. Piel* 2016; 27:178-81.
- Pierie JP, Choudry U, Muzikansky, A et al. Prognosis and management of extramammary Paget's disease and the association with secondary malignancies. *J Am Coll Surg* 2014; 196:45-50.
- Estadística Nacional. Ecuador. Imbabura .2017
- Hendi A, Brodland DG, Zitelli JA. Extramammary Paget's disease: surgical treatment with Mohs micrographic surgery. *J Am Acad Dermatol*. 2015; 51:767-73
- Wagner G, Sachse MM. Extramammary Paget disease - clinical appearance, pathogenesis, management. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2017; 4:1-7.

Recibido: 23 agosto 2017

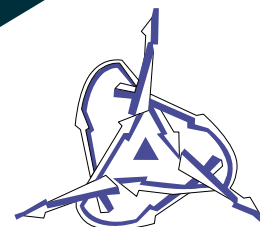
Aprobado: 20 octubre 2017

BIO MOL®

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.



BIO MOL®
BIO MOL 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 Proteomica, 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.

GET RECOGNITION FOR YOUR PEER REVIEWS

publons.com



✓ **Keep a verified record of every peer review you do**

Don't let your peer review work go unnoticed. With a free Publons profile you can effortlessly track every peer review you do for any of the world's journals, all with the click of a button.

✓ **Connect with top editors to deliver research to the world.**

Editors use Publons to find expert reviewers. Showcase your skills as a reviewer and you might end up on the editorial board.

✓ **Untapped evidence of your esteemed service**

Show the world how journal editors consider you an expert in your field. Bolster your CV with evidence of all your prestigious contributions as an editor and reviewer.



Publons works with researchers, publishers and research institutions to speed up science and research by harnessing the power of peer review.

Publons is part of Clarivate Analytics, the global leader in trusted insights and analytics that accelerate the pace of innovation

SIGN UP, IT'S FREE

publons.com

info@publons.com

ARTÍCULO DE REVISIÓN / REVIEW

Usos potenciales de germoplasma animal masculino con fines de preservación de fauna silvestre

Potential use of animal male germplasm for the preservation of endangered species

Francisco Cabrera¹, Andrés Caicedo², Pedro M. Aponte^{1,3,*}

DOI:10.21931/RB/2017.02.04.10

RESUMEN

El germoplasma animal comprende células o tejidos que pueden generar nuevos individuos. Su preservación y uso puede instrumentarse en la reproducción de animales en peligro de extinción. El germoplasma animal, además de los gametos, incluye células diploides como las células madre, potencialmente capaces de dividirse indefinidamente. Las células madre espermatogoniales (CMEs) generan los espermatozoides en el testículo (espermatogénesis). Las CME ofrecen múltiples opciones biotecnológicas. A diferencia de las células madre ovogoniales (hembras), numerosas CME pueden ser obtenidas durante el periodo postnatal prepuberal pre-meiosico. Estas células pueden ser aisladas, amplificadas in vitro y criopreservadas, para así crear líneas celulares. Las CME pueden inducirse a diferenciar in vivo e in vitro. Las metodologías in vivo, están basadas en el trasplante de CMEs del testículo de un animal donador al testículo de otro receptor sin espermatogénesis, técnicas ya establecidas en animales de laboratorio con potencial para utilizarse en animales domésticos y silvestres. Estos últimos, podrían donar CMEs y animales de especies filogenéticamente relacionadas no amenazadas serían receptores para producir espermatozoides de la especie amenazada. Existen técnicas de trasplante de material testicular preservado de diversos animales al tejido subcutáneo de ratones, donde se desarrolla la espermatogénesis completa. La espermatogénesis in vitro está disponible en ratones. Independientemente de la metodología utilizada, los espermatozoides obtenidos de CME pueden utilizarse en técnicas de reproducción asistida para generar embriones y/o nuevos individuos a fin de repoblar ecosistemas en desequilibrio o aumentar las tasas de mejoramiento genético en sistemas de producción animal.

Palabras clave: Reproducción animal; Germoplasma; Espermatozoides; Espermatogénesis; Especies en peligro; Biotecnología

ABSTRACT

Animal germoplasm comprises cells or tissues that can be used to generate new individuals. It can be used for endangered species reproduction. Besides gametes, animal germoplasm also includes diploid cells such as stem cells, potentially able to divide indefinitely. Spermatogonial stem cells (SSCs) give rise to sperm in the testis (spermatogenesis). SSCs offer many biotechnological possibilities. Contrary to the female oogonial stem cells, numerous SSCs can be obtained during the postnatal prepubertal pre-meiotic period. SSCs can be isolated, amplified in vitro and cryopreserved to establish cell-lines. SSCs can also be induced to differentiate in vivo and in vitro. In vivo methods are based on the transplantation of SSCs from a donor testis to a recipient with endogenous spermatogenesis depleted. These techniques have been established mainly in laboratory rodents and have promising potential for domestic and wild animals. The last could be used as donors of SSCs and recipients could be common phylogenetically-related, non-threatened domestic species. Thus, domestic males would eventually produce endangered species sperm. Testicular cells or tissues can also be transplanted to the back-skin of mouse where spermatogenesis resumes and foreign sperm generates, as tested in many species. Spermatogenesis in vitro has been accomplished only in mice. Regardless of the method used, sperm coming from SSCs could be used through artificial reproductive techniques to generate embryos and new individuals to repopulate unstable ecosystems or to genetically improve animal production systems

Keywords: Animal Reproduction; Germplasm; Spermatozoa; Spermatogenesis; Endangered species; Biotechnology

Introducción

El germoplasma animal comprende todos aquellos recursos genéticos, bajo la forma de células o tejidos, con posibilidad de utilización en la generación nuevos individuos, con la consiguiente transmisión de información genética de una generación a la siguiente. Su colecta y preservación puede ser realizada con fines de investigación, conservación y reproducción de una especie determinada. La concepción tradicional del uso de germoplasma animal con fines reproductivos se ha limitado a la posibilidad de almacenamiento y manipulación de gametos (espermatozoides y ovocitos). Sin embargo, los diferentes tipos de células madre generadoras de estos gametos (pertenecientes a la llamada línea germinal), ofrecen posibilidades de reproducción por vías biotecnológicas alternativas y sustentables. Estos tipos celulares diploides contrastan en su posibilidad de división teóricamente indefinida con las células haploides terminalmente diferenciadas correspondientes a los gametos, que en los bancos de germoplasma corrientemente en uso tienen la desventaja de

ser recursos genéticos finitos. Durante la historia contemporánea han ido apareciendo sucesivamente cuatro generaciones de biotecnologías reproductivas.¹ Las tres primeras generaciones (cuyas tecnologías de base principales incluyen la Inseminación artificial, transferencia de embriones y la fertilización in vitro) están basadas en el uso de germoplasma gamético. La cuarta generación, en plena vigencia en la actualidad, involucra la utilización de otros tipos celulares diploides germinales, e incluso células somáticas con pluripotencialidad inducida (iPS)².

Células madre espermatogoniales

Todos los órganos de los animales adultos presentan células madre que sostienen su funcionalidad. Estas células se organizan en torno a los llamados sistemas de célula madre que le dan protección a estas células en la medida que estas se renuevan a sí mismas (autorenovación clonal) y a la vez generan células

¹Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Colegio de Ciencias de la Salud, Escuela de Medicina Veterinaria, Campus Cumbayá, Diego de Robles y Vía Interoceánica, 170157 Quito, Ecuador

²Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Colegio de Ciencias de la Salud, Escuela de Medicina, Campus Cumbayá, Diego de Robles y Vía Interoceánica, 170157 Quito, Ecuador

³Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Campus Cumbayá, Diego de Robles y Vía Interoceánica, 170157 Quito, Ecuador

*Autor de correspondencia: pmaponte@usfq.edu.ec

hijas comprometidas a la diferenciación y que cumplirán con la funcionalidad del órgano. Tal es el caso del sistema de célula madre responsable de la formación de los gametos masculinos (espermatozoides) en el testículo a través del proceso de la espermatogénesis que incluye diferentes pasos de mitosis, meiosis y diferenciación.³ Las células madre espermatogoniales (CMEs) son las células madre de la línea germinal sobre las que la espermatogénesis se sustenta. Estas se encuentran dentro del compartimiento basal de los túbulos seminíferos del testículo, (epitelio seminífero) y eventualmente darán origen a los espermatozoides.³ Como todas las células madre, las CMEs son capaces de dividirse asimétricamente para generar células comprometidas a la vía de la diferenciación (linaje de amplificación de tránsito, espermatozoides, espermátidas y espermatozoides) y sus propios clones.⁴ En condiciones de emergencia (daño testicular), las CMEs por medio de divisiones simétricas exclusivamente se autorenewan a fin de regenerar su pool original para así generar las cohortes de células diferenciadas que harán de nuevo al testículo funcional. Las CMEs, pertenecientes a la línea germinal, ofrecen múltiples aplicaciones biotecnológicas importantes.⁵ A diferencia de sus equivalentes de la línea germinal femenina, las CMEs pueden ser obtenidas en grandes cantidades en animales durante el periodo postnatal prepuberal, cuando todavía estas aún no han entrado en el proceso de meiosis, siendo de esta manera el pool de células madre germinales en la gónada masculina (testículo), altamente prevalente en el periodo mencionado. Una vez que se inicia el periodo pre-puberal, comienza la primera onda espermatogénica que consiste en la ocurrencia de las primeras divisiones asimétricas de las CMEs que conducirán a la primera generación de espermatozoides al momento de la pubertad.⁶ Una vez que avanza la primera onda espermatogénica, el porcentaje de CMEs comenzará a disminuir al aumentar progresivamente el número de células en vías de diferenciación dentro del túbulo seminífero, dificultándose así su obtención con alta pureza. Estas células pueden ser aisladas, amplificadas *in vitro* y criopreservadas, lo cual conlleva a la posibilidad de establecer líneas celulares inmortales.^{7,8}

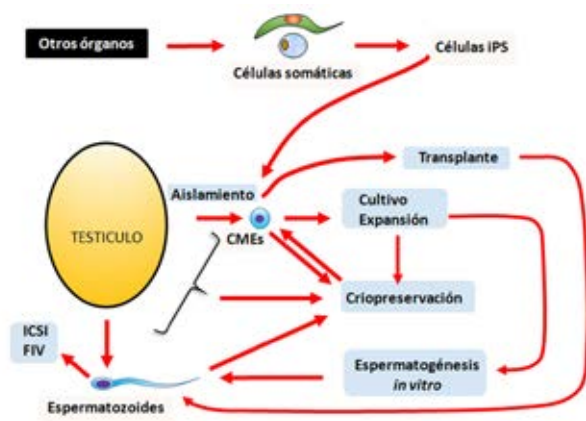


Figura 1. Resumen de las posibles aplicaciones de las células madre espermatogoniales (CMEs) para la obtención de gametos masculinos (espermatozoides) con fines reproductivos. Las CMEs pueden ser obtenidas a partir de la línea germinal masculina adulta presente en el testículo o alternativamente ser derivadas de células madre pluripotenciales inducidas (iPS) a partir de células somáticas. Las CMEs pueden ser transplantadas a un testículo receptor o cultivadas *in vitro* a fin de obtener espermatozoides. Existen actualmente protocolos para la criopreservación de las células mencionadas en la figura. Los espermatozoides obtenidos se pueden utilizar para fertilizar las especies de interés a través de técnicas de reproducción asistida tales como la inyección intracitoplasmática (ICSI) o la fertilización *in vitro* (FIV).

Biotecnologías reproductivas y células madre espermatogoniales

La disponibilidad de las tecnologías que utilizan células diploides como germoplasma, conlleva al desarrollo de técnicas con gran incidencia en campos tan diversos como la producción animal, medicina regenerativa y preservación de especies amenazadas o en peligro de extinción. Para este fin, la reproducción animal representa un área primordial. Estos enfoques requieren de un almacenamiento inicial de todo germoplasma animal aprovechable, incluso al momento de fallecer los animales por causas que no conlleven a una pérdida de la integridad de los tejidos o células objeto de estas técnicas. Se hacen necesarios esfuerzos de investigación con el fin de determinar las mejores vías de preservación del germoplasma dada la heterogeneidad de tejidos potencialmente utilizables en diferentes especies animales. Al estar disponibles células germinales diploides en bancos de germoplasma, estas pueden eventualmente ser inducidas a proliferar y entrar a la vía de diferenciación celular tanto *in vivo* como *in vitro*. El objetivo de la diferenciación de las CMEs sería la obtención de espermatozoides de la especie de interés, es decir, de la cual queremos obtener descendencia. Las metodologías de diferenciación *in vivo*, están basadas en el trasplante de CMEs del testículo de un animal donador al testículo de un animal receptor cuya producción endógena de espermatozoides ha sido previamente eliminada.⁹ Muchas de estas técnicas se han desarrollado en especies murinas, no habiéndose todavía establecido para la mayoría de los animales domésticos y prácticamente siendo inexistentes para su uso en animales silvestres, muchos de los cuales se encuentran amenazados o en peligro de extinción. Estos últimos, podrían ser donadores de CMEs y los animales receptores serían animales de especies filogenéticamente relacionadas y cuya existencia no esté amenazada, de manera que las gónadas de estos últimos produzcan espermatozoides de la especie silvestre (Figura 1). Por ejemplo, CMEs de un felino silvestre en peligro de extinción (*Leopardus pardalis*) han sido transplantadas al testículo de un gato doméstico, el cual es capaz de generar espermatogénesis de la especie foránea.¹⁰ También es posible obtener trozos de tejido testicular previamente obtenidos de especímenes silvestres fallecidos, los cuales pueden ser criopreservados y posteriormente colocados quirúrgicamente en la piel (tejido subcutáneo) de ratones inmunocomprometidos de manera de generar espermatogénesis local con producción de espermatozoides normales en esa xenolocalización.^{11,12} Incluso, si se xenotransplantan células en suspensión generadas a partir de tejidos testiculares íntegros, las células transplantadas tienen la capacidad de organizarse de novo como tejido testicular en el tejido subcutáneo de los ratones utilizados, obteniéndose asimismo una espermatogénesis normal.¹³ En este caso, el tejido testicular se organiza como una mini-gónada sostenida por el tejido circundante, principalmente a través de la neoformación e invasión de vasos sanguíneos provenientes del huésped (ratón). Este neotestículo contribuye a la producción de andrógenos que mantienen los caracteres sexuales del ratón hospedador. Los espermatozoides así producidos pueden entonces utilizarse para la producción de crías de la especie amenazada. Otra posibilidad muy importante sería el desarrollo de la producción de espermatozoides (espermatogénesis) *in vitro*, sólo realizada experimentalmente con éxito hasta el momento en ratones¹⁴ y que evitaría el uso de animales receptores en procedimientos de trasplante de CMEs. Estas últimas células generarían los espermatozoides necesarios *in vitro* que serían utilizados en técnicas de reproducción asistida a fin de generar embriones que al ser transplantados a una hembra receptora podrían generar un nuevo individuo, que en el contexto de la reproducción de animales amenazados o en peligro de extinción, sería de gran importancia.

Perspectivas en investigación

Para el desarrollo de estas biotecnologías reproductivas, se hace necesario inicialmente conocer la morfología y fisiología básica de numerosas especies silvestres como por ejemplo el estudio previo de la morfofisiología de los órganos asociados a la reproducción (gónadas, conjunto de sistemas excretorios y glándulas anexas), así como diferentes aspectos de control hormonal y regulación local a nivel gonadal, para posteriormente contar con técnicas precursoras que incluyan el aislamiento de las células madre de la línea germinal postnatal, su caracterización fenotípica, cultivo, expansión in vitro y finalmente su criopreservación⁶, lo cual ya se ha venido realizando para algunas especies domésticas. Otras técnicas que incluyen la criopreservación de gónadas enteras no han avanzado tan rápidamente, aunque recientemente ha habido avances en seres humanos¹⁵. Existen pocos reportes en relación al proceso de criopreservación de gónadas enteras o trozos de tejido provenientes de animales domésticos y aún menos de animales silvestres, esto con miras a posibles trasplantes o a la obtención posterior de las células madre germinales contenidas en estos órganos (CMEs o células madre ovogoniales). También se hace necesario explorar la obtención y manipulación de espermatozoides por otras vías, utilizando biotecnologías de la cuarta generación (reservas epididimarias, espermatogénesis in vitro y derivación a partir de células iPS).

Conclusiones

El éxito de las tecnologías planteadas confluye a través de diversas vías y enfoques en la obtención de gametos con el fin de generar embriones (in vivo o in vitro), que a su vez serían implantados en hembras receptoras, para de esta forma generar individuos con fines tan relevantes como repoblar ecosistemas en desequilibrio o aumentar las tasas de mejoramiento genético en sistemas de producción animal.

Referencias bibliográficas

1. Thibier M. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod Nutr Dev* 2005; 45:235–42. doi:10.1051/rnd:2005016.
2. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126:663–76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
3. de Rooij DG, Griswold MD. Questions about spermatogonia posed and answered since 2000. *J Androl* 2012; 33:1085–95. doi:10.2164/jandrol.112.016832.
4. Alison MR, Poulosom R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. *J Pathol* 2002; 197:419–23. doi:10.1002/path.1187.
5. Aponte PM. Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. *World J Stem Cells* 2015; 7:669–80. doi:10.4252/wjsc.v7.i4.669.

6. Aponte PM, van Bragt MPA, de Rooij DG, van Pelt AMM. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 2005; 113:727–42. doi: 10.1111/j.1600-0463.2005.apm_302. x.
7. Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, Ouden K den, de Rooij DG. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reprod Camb Engl* 2002;124:85–94. doi: 10.1530/rep.0.1240085
8. Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SKM, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M, et al. Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. *JAMA* 2009;302:2127–34. doi:10.1001/jama.2009.1689.
9. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11298–302. doi:10.1073/pnas.91.24.11298
10. Silva RC, Costa GMJ, Lacerda SMSN, Batlouni SR, Soares JM, Avelar GF, et al. Germ cell transplantation in felids: a potential approach to preserving endangered species. *J Androl* 2012;33:264–76. doi:10.2164/jandrol.110.012898.
11. Dobrinski I. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. *Anim Reprod Sci* 2005; 89:137–45. doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.06.020.
12. Campos-Junior PHA, Costa GMJ, Avelar GF, Lacerda SMSN, da Costa NN, Ohashi OM, et al. Derivation of sperm from xenografted testis cells and tissues of the peccary (*Tayassu tajacu*). *Reprod Camb Engl* 2014; 147:291–9. doi:10.1530/REP-13-0581.
13. Dobrinski I. De novo morphogenesis of functional testis tissue after ectopic transplantation of isolated cells. *Organogenesis* 2007; 3:79–82. doi:10.4161/org.3.2.4944
14. Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, et al. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 2011; 471:504–7. doi:10.1038/nature09850.
15. Baert Y, Braye A, Struijk RB, van Pelt AMM, Goossens E. Cryopreservation of testicular tissue before long-term testicular cell culture does not alter in vitro cell dynamics. *Fertil Steril* 2015. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.07.1134.

Recibido: 23 octubre 2017

Aprobado: 11 noviembre 2017

ARTÍCULO DE REVISIÓN / REVIEW

Valorización del suero de leche: Una visión desde la biotecnología

Milk whey valorization: An overview from Biotechnology

José M. Pais Chanfrau^{1*}, Jimmy Núñez Pérez¹, Marco V. Lara Fiallos¹, Leonor M. Rivera Intriago^{2,3}, Luis E. Trujillo Toledo⁴, Milton J. Cuaran Guerrero¹.

DOI.10.21931/RB/2017.02.04.11

RESUMEN

La Zona 1 del Ecuador (provincias de Esmeraldas, Carchi, Ibarra y Sucumbíos) es una región eminentemente ganadera, donde se alcanzan importantes volúmenes de leche, en especial, en las provincias andinas del Carchi e Ibarra. Casi un tercio de toda la leche se destinan a la producción de los diferentes tipos de quesos, generándose cantidades apreciables de suero de leche. Una parte importante del suero de leche se emplea en la alimentación animal, más otra, es vertida a los ríos, arroyos y quebradas, contaminando las fuentes naturales de agua. Regulaciones medioambientales más rigurosas, por un lado, y la toma de conciencia por otra, han puesto en evidencia la necesidad de transformar el suero de leche en efluentes menos contaminantes. Si adicionalmente se logra que como resultado de esta transformación se logran obtener nuevos productos de mayor valor agregado que el propio suero de leche, se amortizaría en parte los recursos empleados en la transformación. En la presente revisión se exploran, desde las biotecnologías, algunas de las tecnologías disponibles y se discuten las vías para lograrlo en el contexto de la Zona 1 del Ecuador.

Palabras claves: suero de leche, permeado de suero de leche, proteína unicelular, ácido láctico, kefirán, galacto-oligosacáridos.

ABSTRACT

Zone 1 of Ecuador (provinces of Esmeraldas, Carchi, Ibarra and Sucumbíos) is an eminently cattle region, where important daily volumes of milk are reached, especially the Andean provinces of Carchi and Ibarra. Almost a third of all milk is used for the production of different types of cheeses, generating considerable amounts of whey. An important part of whey is used in animal feed, plus another, is poured into rivers, streams and badlands, polluting natural sources of water. More stringent environmental regulations on the one hand and awareness on the other have highlighted the need to transform whey into less polluting effluents. If, as a result of this transformation, it is possible to obtain new products with higher added value than the whey itself, the resources used in the transformation would be partially amortized. In the present review, some of the available technologies are explored from biotechnologies, and ways to achieve this are explored in the context of Zone 1 of Ecuador.

Key words: Milk whey, whey permeate, single-cell protein, lactic acid, kefiran, galacto-oligosaccharides.

Introducción

En la Zona 1 del Ecuador (Carchi, Imbabura, Esmeraldas y Sucumbíos) la actividad agrícola y ganadera ocupa una parte importante de la actividad económica y laboral de estos territorios. La mayor parte de la población de esta Zona se dedica a la producción y comercialización de leche, siendo la provincia del Carchi la que más se destaca alcanzando un 4,8% de la producción nacional de leche, alcanzando una producción diaria de alrededor de 79.8 m³¹. De acuerdo con el Ministerio de Coordinación de la Producción, Empleo y Competitividad en el 2011, la provincia del Carchi la actividad principal es el procesamiento lácteo, que genera un valor de producción de alrededor de US\$ 3.5 millones, lo que implica una generación de valor agregado de US\$ 702 mil. Esta actividad representa el 61% de la producción industrial a nivel provincial. La producción artesanal de transformación no está considerada dentro de estos

datos, la cual es bastante importante en términos de producción de derivados lácteos. Uno de los derivados más consumidos después de la leche fluida es el queso y en el Ecuador los quesos frescos son los más apetecidos: criollo, mozzarella, amasado y cuajadas en general². En los últimos ocho años el consumo per cápita de queso se duplicó, este pasó de 0.75 kg por persona al año en el 2006 a 1.57 kg el año 2014². Las ventas de la industria quesera crecieron 3.4 veces entre el 2006 y el 2014, al pasar de US\$ 71.4 millones a 243.1 millones en éste periodo. Alrededor de un tercio de la producción lechera de la región se dedica a la producción de los diferentes tipos de queso². Como resultado de la producción de los diferentes tipos de quesos, se obtiene el suero de leche (SL). Por cada 100 kg de leche empleados para producir quesos, se obtienen 9.3 ± 0.7 kg de queso fresco³ y alrededor 90.7 kg de suero de leche^{4,5}. El SL retiene gran parte de los nutrientes

¹ Grupo de Investigación de Lácteos (GILAC). Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales (FICAYA). Universidad Técnica del Norte (UTN). Ave. 17 de julio, 5-21, y Gral. José Ma. de Córdova, CP 100105, Ibarra, Imbabura, Ecuador. *Autor de correspondencia: jmpais@utn.edu.ec

² Universidad Técnica de Machala, Machala, El Oro, Ecuador.

³ Unidad de Post-gradado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos-Perú.

⁴ Industrial Biotechnology and Bioproducts Research Group, Center for Nanoscience and Nanotechnology, CENCINAT, Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE), Ave. Rumiñahui s/n. Quito, Pichincha, Ecuador.

de la leche, de ahí que este subproducto posea un elevado poder contaminante alcanzando valores de DBO_5 , de entre $30-50 \text{ kg m}^{-3}$. Se han propuesto diversas soluciones a este problema desde la biotecnología^{4,6,7}, los cuales abarcan desde el empleo del suero en la alimentación animal⁸ hasta su tratamiento biológico con lodos para producir abonos orgánicos para el mejoramiento de los suelos⁹. Uno de los usos más atractivos es en la obtención de productos basados en el aislamiento de las proteínas del suero¹⁰, brindando un concentrado proteico de excelente calidad para el consumo humano y animal¹¹. Sin embargo, como resultado del proceso de aislamiento de las proteínas del suero se obtiene un permeado de suero (PS) de leche con niveles muy altos de lactosa, y por ende con elevados valores de carga contaminante¹²⁻¹⁴. Diversos usos han sido propuestos para el PS, que abarcan desde la producción de proteína unicelular microbiana para la alimentación animal^{15,16}, la producción de ácidos orgánicos^{17,18}, etanol¹⁹, hasta la obtención de pro-bióticos²⁰ y diferentes sustancias prebióticas²¹⁻²³. Estas soluciones no solo podrían lograr disminuir la carga contaminante del PS de leche, sino que permiten valorizar este subproducto al obtener diversas sustancias de mayor valor agregado. El objetivo de esta revisión es explorar diversas soluciones técnicas que contribuyan al empleo y valorización del suero de leche o su permeado desde las biotecnologías, y que contribuyan a incentivar el continuo crecimiento de la Industria láctea de la Zona 1 del Ecuador.

El suero de leche – subproducto de la producción de quesos, la principal limitante para el crecimiento del sector lechero.

Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos del Ecuador, en el 2012 se registraron un promedio de 5,6 millones de litros de leche diarios a nivel nacional. En la región Sierra la producción de leche llega al 76,7% del total, Imbabura y Carchi producen del 7,4% de la producción nacional de leche, esto es más de 407 m³ diarios. Alrededor de un tercio de toda la leche se emplea en la producción de los diferentes tipos de quesos², lo que representa alrededor de 135.67 m³ diarios de leche. Estos volúmenes generan alrededor de 122 m³ diarios de suero de leche en las provincias de Imbabura y el Carchi. El suero de leche (SL), representa el 85-95% del volumen de leche y retiene el 55% de todos los nutrientes contenidos en la leche^{5,24}, por lo que constituye el principal subproducto y el mayor contaminante en la producción quesera^{6,25,26}, alcanzando valores de DQO y DBO_5 de entre 60-80 y de $30-50 \text{ kg m}^{-3}$, respectivamente^{27,28}. A nivel mundial se producía en el año 2013, alrededor de 180 millones de toneladas métricas (TM) de suero de leche²⁹, de los cuales, se utilizan algo más del 40% en la alimentación animal directa, como

fertilizante o se desecha, mientras que el resto se transforma en la industria, básicamente en la producción de suero en polvo, lactosa y concentrados de proteínas del suero. Como hace notar acertadamente Kosikowski⁵ no es lo mismo “desechar” que “utilizar” el suero de leche. Aún hoy, importantes cantidades de SL son vertidos en ríos y quebradas, o son asperjados directamente en los campos cultivados, previa dilución⁵. Esto último, a pesar de las ventajas aparentes que pudieran ser observadas, luego de largos periodos de vertimiento, el elevado contenido de sal en el SL tiende a salinizar los suelos, disminuyendo así los rendimientos agrícolas. Adicionalmente, cada vez más se tiene mayor conciencia en estos efectos adversos y las normas y leyes ambientales de los estados tienden a prohibir estas prácticas. Como consecuencia de ello, a pequeños y medianos productores de quesos, pudiera hacerseles difícil competir en el mercado con las grandes empresas, ante la necesidad de disponer de adecuadas plantas de tratamiento de residuales donde tratar sus efluentes de suero de leche. Esta “presión” medioambiental y regulatoria se convertiría en una limitante al crecimiento de la producción de los pequeños y medianos productores de quesos. Existen numerosas revisiones sobre los diferentes usos a los que puede destinarse el SL³⁰⁻³². En primera instancia, el SL puede emplearse en la propia alimentación animal, debido a las importantes cantidades de lactosa (4.5-5% (m/v)), proteínas (0.6-0.8% (m/v)), lípidos (0.4-0.5% (m/v)) y sales minerales (8-10% en base seca) que contiene el suero de leche²⁸. En la Figura 1, se muestran varios de los usos a que puede destinarse el suero de leche.

Entre los usos más promisorios está el basado en el aislamiento de las proteínas del suero de leche^{33,34}, por la elevada calidad de estas proteínas y sus efectos benéficos sobre la salud humana y animal^{11,35,36} y la simplicidad del proceso (Fig. 2). La tecnología de membranas es la más empleada en la concentración del SL^{37,38}. El proceso se basa en sucesivos pasos de ultrafiltración (UF) y ósmosis inversa (RO), seguidos de la evaporación y el secado por aspersión (spray-drier).

Sin embargo, como resultado de esta tecnología se obtiene un permeado del suero (PS) de leche, des-proteinizado, subproducto rico en lactosa (3.9-4.8% (m/v)), sales minerales y cenizas (0.3-0.8% (m/v)) y trazas de proteínas (0.1-0.3% (m/v))³⁹, lo que le confiere niveles de $DBO_5 > 30 \text{ kg m}^{-3}$ ⁴⁰ y, por ende, un elevado poder contaminante, por lo que ha de ser tratado o utilizado como materia prima para otros procesos. La principal causa de su elevado valor de DBO_5 es la lactosa, un disacárido que tiene usos en las industrias química, alimentaria y farmacéutica⁴¹⁻⁴³.

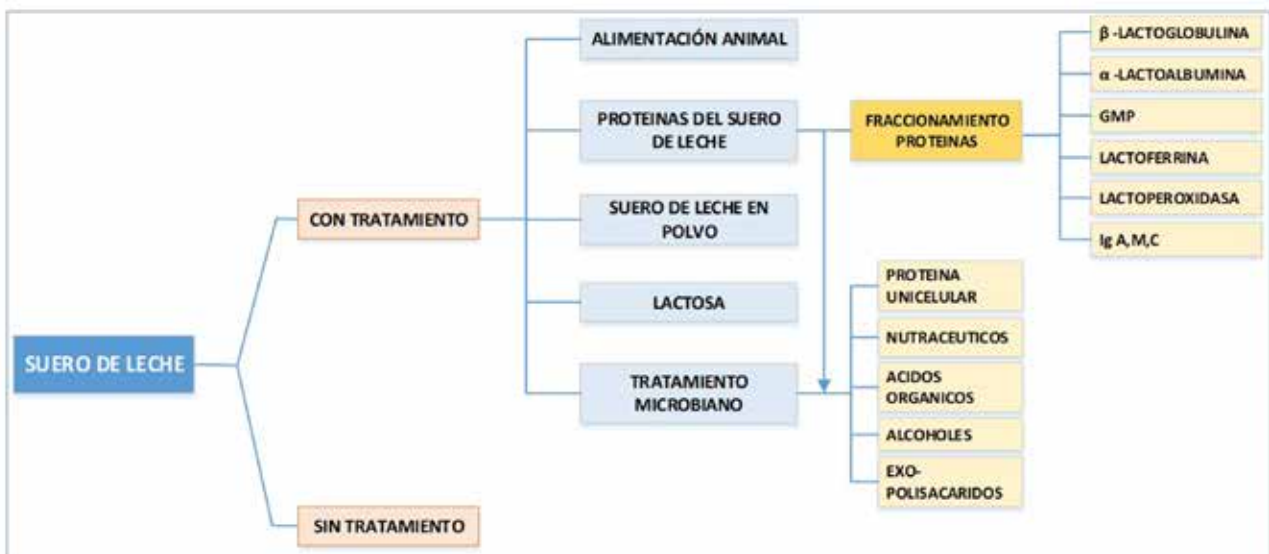


Figura 1. Algunos usos reportados del suero de leche.

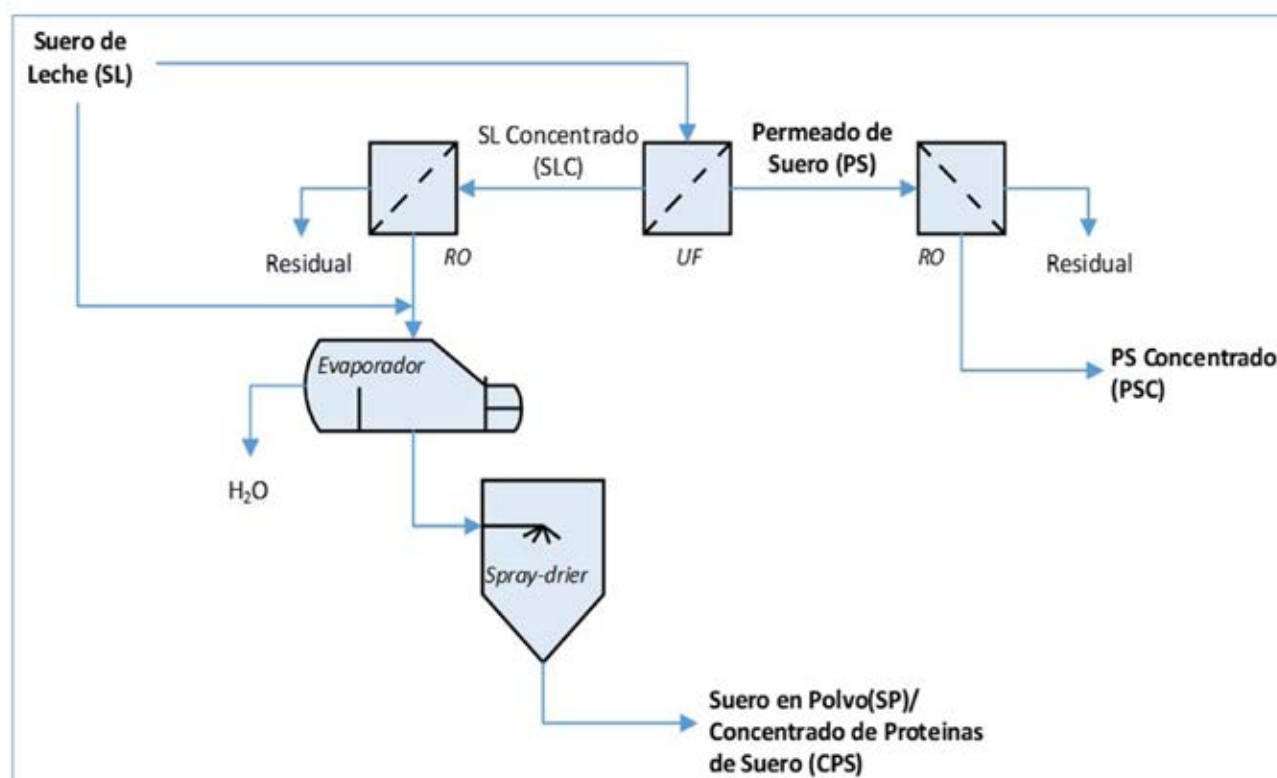


Figura 2. Proceso de obtención de concentrado de proteínas de suero (CPS).

Procesos biotecnológicos basados en la acción microbiana sobre el permeado de suero (PS).

Otro grupo de productos pueden ser obtenidos por la biotransformación de la lactosa presente en el PS. Algunas revisiones del tema han sido realizadas^{7,29,31,33} las cuales muestran las variadas posibilidades que existen para valorizar este subproducto. Uno de los productos que pueden ser obtenidos es el ácido láctico ($C_3H_6O_3$, CAS L(+): 79-33-4). Este ácido orgánico tiene usos en la industria alimenticia y cosmética⁴⁴⁻⁴⁶. El L(+)-ácido láctico puede ser obtenido a partir de la biotransformación de la lactosa por cepas de *Lactobacillus* spp., como el *Lactobacillus casei*^{34,47-49}. Este proceso puede ser realizado por la transformación microbiana directa⁵⁰⁻⁵², o inmovilizando las células microbianas y empleando un cultivo continuo en un biorreactor empacado de células inmovilizadas^{53,54}, como se muestra en la Figura 3. El proceso convencional consiste, brevemente, en una etapa de fermentación donde se suplementa el PS con sales y vitaminas, para lograr el crecimiento de la BAL seleccionada (por ejemplo, *Lactobacillus casei*), manteniendo el pH cerca de las condiciones óptimas de crecimiento^{47,52}. Posteriormente, se separan y lavan, la biomasa obtenida y el lactato de calcio por centrifugación diferencial. El lactato de calcio, luego es convertido en ácido láctico por la adición de ácido sulfúrico. Seguidamente, el ácido láctico es separado del poco soluble sulfato de calcio. Finalmente, el ácido láctico es concentrado por evaporación hasta alrededor del 50% (v/v) (Fig. 3A). En otra alternativa, pudiera inmovilizarse células de BAL, en alginato de calcio, y conformar un biorreactor continuo enzimático, para convertir el lactato presente en el PS, en ácido láctico⁵³⁻⁵⁵ (Fig. 3B). Adicionalmente, de este proceso pudiera obtenerse la biomasa liofilizada del *L. casei*, un reconocido probiótico⁵⁶ cuya ingesta confiere beneficios a la salud humana⁵⁶⁻⁵⁸. La lactosa presente en el SL, PS o el PSC pudiera ser usada para obtener proteína unicelular (PUC) microbiana, empleando, por ejemplo, la levadura *Kluyveromyces marxianus*^{15,59}, una levadura reconocida como segura (estatus GRAS) y capaz de metabolizar la lactosa y alcanzar altas densidades celulares. Adicionalmente, esta levadura, es capaz de producir niveles importantes de etanol⁶⁰⁻⁶²,

de amplios usos en toda la industria. Un posible esquema productivo para la producción de PUC y etanol a partir del SL, PS o PSC y *K. marxianus* se muestra en la Figura 4. Brevemente, el proceso consiste en una etapa formada por la fermentación (continua o semicontinua) donde crecerá la levadura escogida (por ejemplo, *K. marxianus*). Posteriormente, previa inactivación térmica del cultivo, se separan y lava la biomasa del sobrenadante. Finalmente, se seca por aspersión la biomasa, mientras que del sobrenadante puede ser recuperado por destilación el alcohol etílico (grado técnico) obtenido^{60,63}.

Otros ácidos orgánicos, como el ácido propiónico^{18,64,65}, ácido butírico⁶⁶ y ácido cítrico⁶⁷ también han sido producidos por vía microbiana a partir del suero de leche. De igual manera, otros alcoholes, como el butanol han sido biosintetizados a partir de determinadas cepas microbianas y el suero de leche^{68,69}. Finalmente, un consorcio formado por bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras, que cohabitan dentro de un polímero denominado kefirán, y que se denomina gránulo de kéfir, ha sido empleado desde tiempos ancestrales para producir una leche fermentada denominada kéfir de elevados valores nutricionales^{70,71}. Los gránulos de kéfir pudieran emplearse para bio-transformar al SL, PS o el PSC, rico en lactosa, para producir kefirán, un biopolímero comestible, formado por unidades de glucosa y galactosa en proporciones aproximadamente iguales^{72,73}. Recientes estudios⁷⁴⁻⁷⁶, han demostrados varias propiedades beneficiosas para la salud en este biopolímero que lo hacen atractivo en la formulación de fármacos⁷⁶⁻⁷⁹ y en la conservación de alimentos⁸⁰. Debido a ello, ha crecido recientemente el interés en producir este biopolímero comestible y biodegradable⁸¹. Un posible diagrama de proceso para la producción del kefirán a partir del SL, PS o el PSC y gránulos de kéfir, se muestra en la Figura 5. El proceso consiste, en la biotransformación de la lactosa presente en el PS o PSC, por las

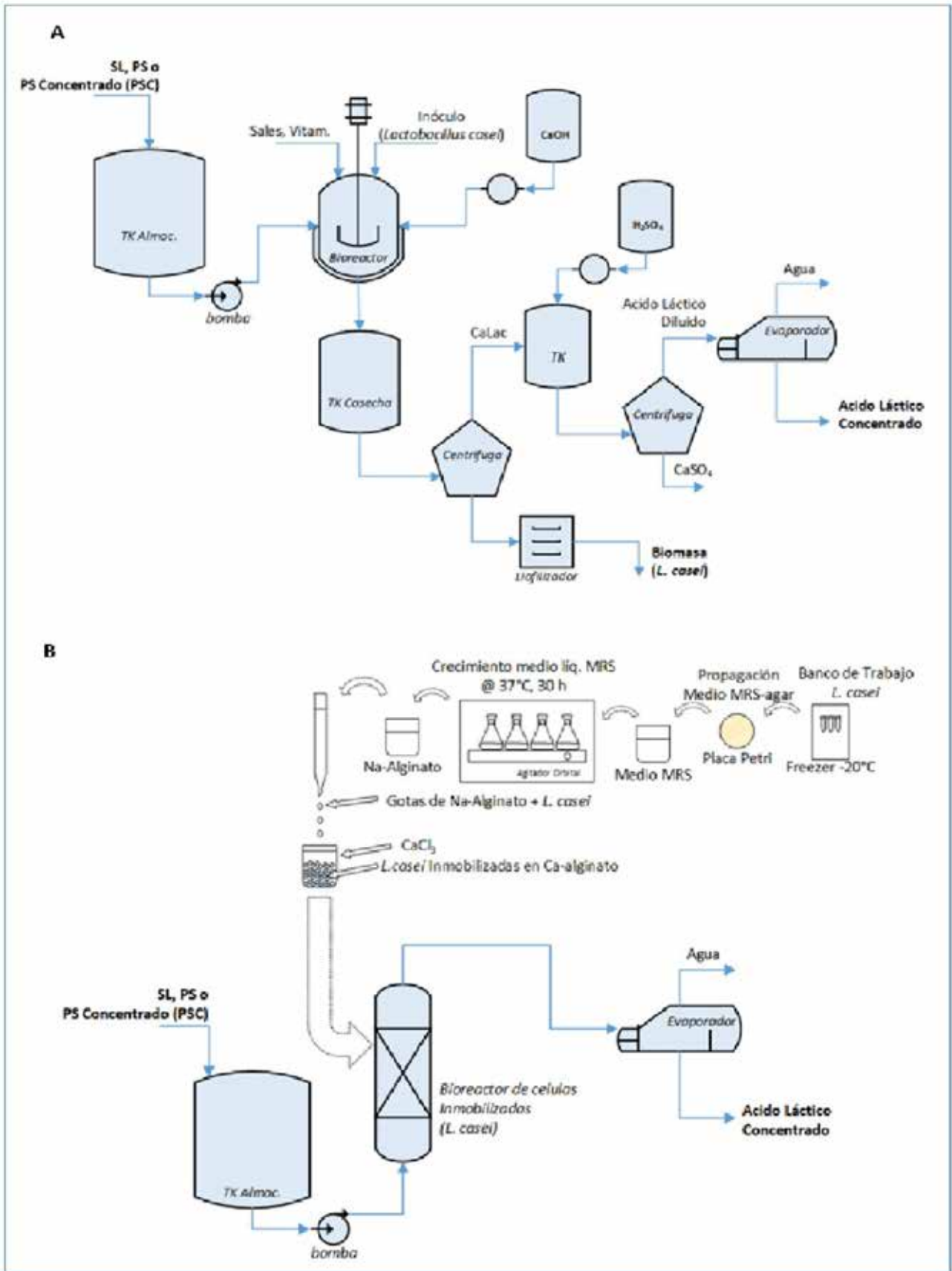


Figura 3. Producción de ácido láctico a partir del SL por (A) transformación microbiana con *L. casei*; (B) transformación enzimática mediante células de *L. casei* inmovilizadas.

BAL del consorcio existente en el gránulo de kéfir. Al cabo de unas 48 h y finalizada la etapa de fermentación, se homogeniza el cultivo y se pasteuriza, para inactivar las enzimas hidrolíticas, posteriormente se separan los restos celulares y se precipita el kefirán soluble con etanol, después de determinado tiempo, se centrifuga y separa el precipitado, el cual es sometido a varios lavados con agua caliente, hasta eliminar los restos de lactosa. Finalmente, el kefirán puede ser secado al horno a 60°C por 24 h⁸¹.

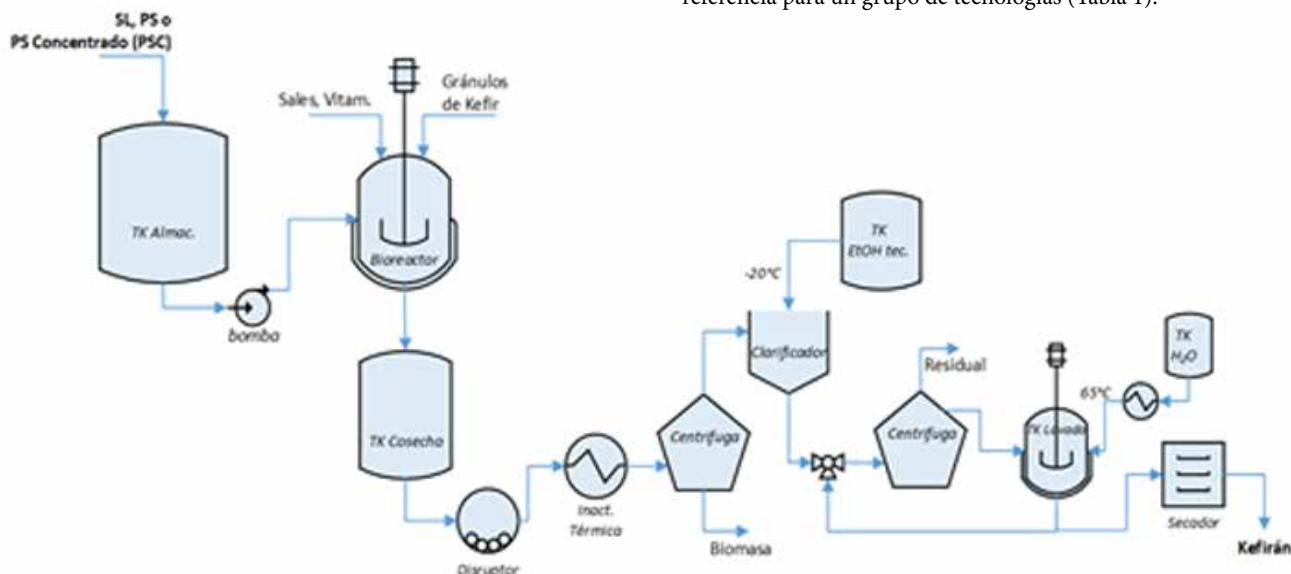


Figura 5. Diagrama de Flujo del Proceso de producción de kefirán a partir del SL, PS o PSC y gránulos de kéfir.

Procesos biotecnológicos basados en la acción enzimática sobre el permeado de suero (PS).

Por último, algunas enzimas, como la enzima hidrolítica beta-galactosidasa (EC 3.2.1.23), pudieran ser empleadas para hidrolizar o polimerizar la lactosa, presente en el SL, PS o el PSC. A concentraciones menores al 30% (m/v) predomina la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa⁸²; mientras que, a concentraciones mayores pudiera favorecerse la reacción de la trans-galactosilación y la formación de galacto-oligosacáridos (GOS)⁸³. Algunos autores han destacado los efectos benéficos de los GOS sobre la salud humana^{84,85}, considerándolos sustancias prebióticas^{86,87}. En la hidrólisis de la lactosa, ésta se favorece a concentraciones por debajo de 30% (m/v) de lactosa^{21,82,83,88,89}. En este caso se favorece la reacción enzimática de hidrólisis:



Donde Lac, Glu y Gal representan a la lactosa (Glu-Gal), la glucosa y la galactosa, respectivamente. Puede ser acoplado al tanque colector un sistema de nano-filtración que permita separar la lactosa de la glucosa y la galactosa. La lactosa puede ser reutilizada, mientras que la mezcla de glucosa y la galactosa, puede ser concentrada hasta niveles comercializables, por evaporación. En el caso de que la concentración de lactosa sea > 30-35% (m/v), se favorecería la trans-galactosilación de la lactosa, y pudiera obtenerse galacto-oligosacáridos de diferentes grados de polimerización ($n > 2$), dependiendo del número de especies diferentes de GOS y de las condiciones de la reacción enzimática.

Apuntes para los análisis de factibilidad económica.

La valorización del suero de leche es una decisión estratégica para las Empresas Lácteas debido a que con ello se logra “destrabar” las limitaciones que el SL le impone al crecimiento continuo de la producción lechera. Sin embargo, siempre es

deseable que la inversión necesaria para la implementación de algunas de las tecnologías arriba descritas pueda ser amortizada y brinde ganancias en plazos razonables. Para el análisis económico completo, deben ser tenidas en cuenta cada tecnología en particular, las predicciones de crecimiento del sector, la demanda del mercado y la disponibilidad financiera de las Empresas^{90,91}. A partir de 100 kg de leche fresca, y un rendimiento promedio de 9.30 ± 0.7 kg en la producción de las diferentes clases de queso³ y la generación de alrededor de 90.70 kg de suero de leche dulce, se comparan algunos de los rendimientos reportados y precios de referencia para un grupo de tecnologías (Tabla 1).

Como se observa, los precios de los productos varían desde aquellos que están por debajo del que se obtendría de la comercialización de la propia leche fresca (8.3 kg leche fluida kg leche entera en polvo⁻¹, por tanto: 100 TM leche fluida equivalen a 12 TM de leche entera en polvo aproximadamente y cuyo precio ronda US\$3 200/TM), hasta aquellos que sobrepasan los dos dígitos al de la leche (Fig. 6). Estos valores permiten clasificar a las tecnologías de valorización del suero de leche, en aquellas que brindan bajos, medios y altos ingresos (Fig. 6).

Adicionalmente, nótese que, durante el proceso de valorización del suero de leche, se logra disminuir apreciablemente la carga contaminante de los efluentes, que es una de las razones de la implementación de estas tecnologías. Pasando de efluentes que requieren tratamientos primarios, secundarios y terciarios (para el tratamiento del SL y PS), a efluentes menos contaminantes, que presumiblemente, solo requieran de un tratamiento primario, lo que abarataría los costos del tratamiento en las Empresas Lácteas.

Conclusiones

La Zona 1 del Ecuador y específicamente las provincias de Carchi e Imbabura, son netamente ganaderas. Una porción importante de la población económicamente activa de estas provincias se dedica a la producción y comercialización de quesos, prevaleciendo los pequeños y medianos productores. Al incrementarse las regulaciones medio-ambientales y paulatinamente, la conciencia ecológica de los productores se hace cada vez más difícil verter, los excedentes lecheros e importantes cantidades de suero de leche en ríos, arroyuelos y quebradas. Por tanto, el crecimiento del sector lechero y quesero de pequeños y medianos productores se ve limitado por los elevados volúmenes de suero de leche que esto traería como consecuencia, dado a los elevados valores de DQO y DBO de este subproducto.

Proceso	Sin Tfo.	CPS	PUC	SP	Glu & Gal	Ac.Lác.	GOS	KEF
Quesos, TM	9.30 ± 0.7 ^a							
Producto Valorizado	-	CPS-34 (34% Prot.)	Proteína UniCelular	Suero en Polvo	Glucosa & Galactosa	Ácido Láctico	Galacto-oligosacáridos	Kefirán
Cant. ^{2,3} , TM	-	2.06	2.18 ^b	5.80	81.63	79.82 ^c	81.63	0.31 ^d
Precio Ref.	-	US\$1974 /TM ^e	US\$1950 /TM ^f	US\$1100 /TM ^g	US\$600-790 /TM ^h	US\$1000 /TM	US\$20-200 /kg	US\$30 /g
Residual	SL	PS	Agua res.	Agua res.	Agua res.	Agua res.	Agua res.	Agua res.
Cant., TM	90.70	88.64	>88.43	84.90	9.07	>10.88	9.07	>90.38
Lac, %(m/v)	4.8	4.7	0.5	0.1	0.4	0.2	0.2	0.2
DQO, kg/m ³¹	70	55	6.0	1.2	4.6	2.3	2.3	2.3

Tabla 1. Datos comparativos. Base de Cálculo: 100 TM de leche fresca.

^a Valor promedio reportado³

^b Asumiendo un rendimiento $Y_{xs} = 0.52$ TM Biom. Seca TM lactosa^{-1 92}, de manera que: $0.52 \cdot (90.70/1.04) \cdot (48/1000) = 2.18$ TM y una reducción del 80-90% de la DQO.

^c Asumiendo un proceso de 36 h donde se consumió el 95.6% de la lactosa presente en el suero (4%) y se alcanzó una concentración de ácido láctico de 33.73 g L^{-1 52}. Por tanto: $Y_{px} = 33.73 / (0.956 \cdot 40) = 0.88$ TM ácido láctico TM lactosa⁻¹ y dens. @ 80% = 1.2 TM m⁻³; Vol. sirope @ (80% (m/v)) = $0.88 \cdot 90.70 / 0.8 = 99.77$ m³ sirope.

^d Resultado sin publicar.

^e Tomado de: <http://www.clal.it/en/?section=sieroproteine> (7 de julio 2017)

^f Tomado de: https://wholesaler.alibaba.com/product-detail/Manufacture-wholesale-price-instant-dry-yeast_60614513305.html?spm=a2700.7782932.1998701000.11.0W8xnR (14 de julio 2017)

^g Tomado de: <http://www.clal.it/en/?section=whey> (7 de julio 2017)

^h Tomado de: https://www.alibaba.com/product-detail/Fructose-Glucose-Maltose-rice-syrup-Factory_60669804468.html?spm=a2700.7724838.2017115.231.87bIGj&s=p (17/7/2017)

¹ Valores asumidos en proporción con la concentración de lactosa en el permeado de suero (PS) de leche.

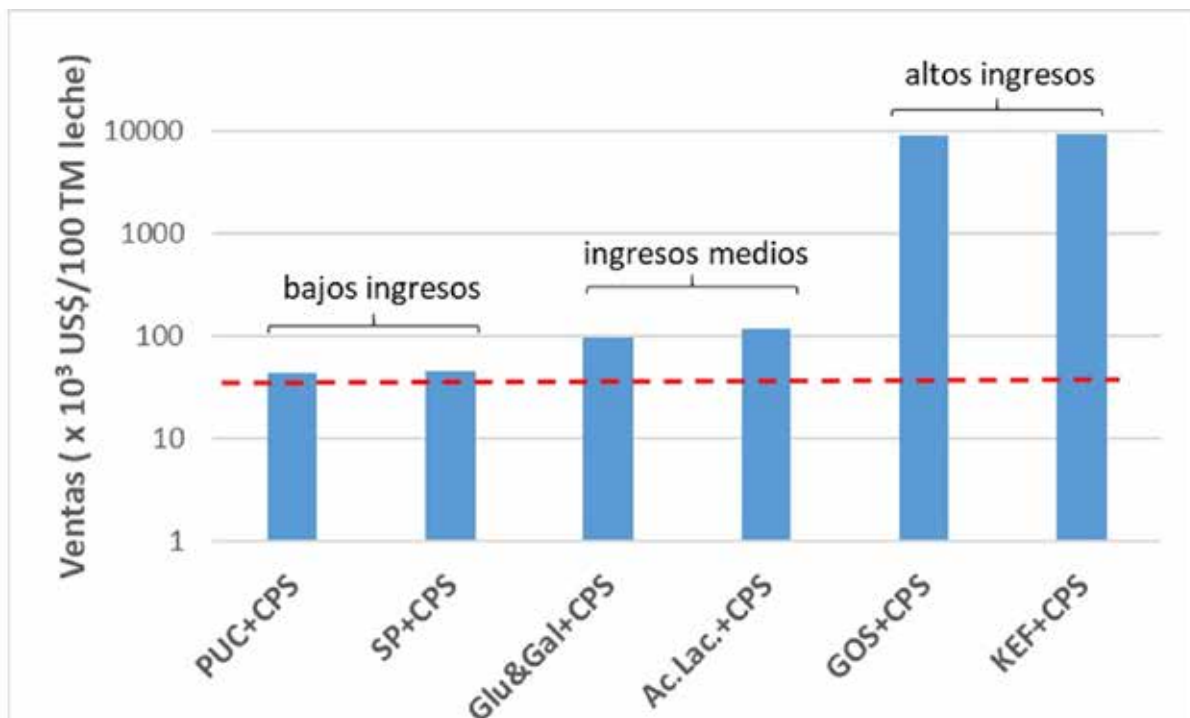


Figura 6. Comparación entre algunas de las tecnologías existentes para la valorización del suero de leche. La línea discontinua representa el precio de la leche en polvo que se obtiene de procesar 100 TM de leche fluida entera.

Una alternativa consiste en buscar disminuir el impacto de los efluentes mediante la búsqueda de tecnologías que utilicen al suero de leche como materia prima de partida, como las discutidas anteriormente en esta revisión.

Sin embargo, para poder implementar estas tecnologías es indispensable acometer un proceso inversionista y disponer de determinados recursos financieros que, difícilmente, estén al alcance de los pequeños y medianos productores de leche y queso, aun cuando éstos eventualmente puedan asociarse en cooperativas para estos fines.

Una posible solución es buscar financiamiento externo, provenientes o del sector privado o del sector estatal, o establecer convenientemente, alianzas público-privadas que permitan acceder a recursos financieros y fomentar emprendimientos, y que permitan, al disponer de estas instalaciones, estimular y fomentar incrementos futuros de la producción de leche entre los pequeños y medianos productores de la Zona 1 y de todo el Ecuador.

La Academia (Universidades, Institutos Técnicos y Centros de Investigaciones), por su parte, pudiera contribuir en aportar los estudios, los desarrollos y las tecnologías más adecuadas, así como en la formación de los emprendedores que puedan acometer estos proyectos. Todos estos esfuerzos, en su conjunto pudieran confluír para garantizar el continuo crecimiento de la producción lechera de la Zona 1 del Ecuador en los venideros años.

Adicionalmente, con las nuevas instalaciones, se generarían nuevas fuentes de trabajo, se sustituirían importaciones actuales y se estaría cambiando y ampliando, la matriz productiva del Ecuador.

Referencias bibliográficas

1. Requelme, N. & Bonifaz, N. Caracterización de sistemas de producción lechera de Ecuador. Univ. Politécnica Sales. Ecuador. Rev La ... 15, 55-68 (2012).
2. Orozco, M. Un tercio de la producción láctea se dedica al queso. Líderes 1 (2015).
3. Dalla Costa, C. A. RENDIMIENTO QUESERO TEÓRICO Y REAL DE LA LECHE DE LA CUENCA DE VILLA MARÍA, CÓRDOBA. (Universidad Católica de Córdoba, Argentina., 2015).
4. Parra, R. a. Why? importance in the food industry. Rev. Fac. Nac. Agropecu. Medellín 62, 4967-4982 (2009).
5. Kosikowski, F. V. Whey Utilization and Whey Products. J. Dairy Sci. 62, 1149-1160 (1979).
6. Marwaha, S. S. & Kennedy, J. F. Whey—pollution problem and potential utilization. Int. J. Food Sci. Technol. 23, 323-336 (1988).
7. Ryan, M. P. & Walsh, G. The biotechnological potential of whey. Reviews in Environmental Science and Biotechnology 15, 479-498 (2016).
8. Cieslak, D. G., Benevenga, N. J. & Grummer, R. H. The evaluation of fresh sweet liquid whey as a protein supplement to maize for growing pigs. Anim. Feed Sci. Technol. 14, 171-181 (1986).
9. Zupan, G. D. et al. Characterization of food waste as feedstock for anaerobic digestion. Bioresource Technology 2, (2013).
10. Sinha, R., Radha, C., Prakash, J. & Kaul, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. Food Chem. 101, 1484-1491 (2007).
11. de Wit, J. N. Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. J. Dairy Sci. 81, 597-608 (1998).
12. Cuartas-Uribe, B. et al. A study of the separation of lactose from whey ultrafiltration permeate using nanofiltration. Desalination 241, 244-255 (2009).
13. Cuartas-Uribe, B., Vincent-Vela, M. C., Álvarez-Blanco, S., Alcaina-Miranda, M. I. & Soriano-Costa, E. Nanofiltration of sweet whey and prediction of lactose retention as a function of permeate flux using the Kedem-Spiegler and Donnan Steric Partitioning models. Sep. Purif. Technol. 56, 38-46 (2007).
14. Narong, P. & James, A. E. Efficiency of ultrafiltration in the separation of whey suspensions using a tubular zirconia membrane. Desalination 219, 348-357 (2008).
15. Somaye, F., Marzieh, M. & Lale, N. Single Cell Protein (SCP) production from UF cheese whey by Kluyveromyces marxianus. 18 th Natl. Congr. Food Technol. 8-13 (2005).
16. Yadav, J. S. S. et al. Food-grade single-cell protein production, characterization and ultrafiltration recovery of residual fermented whey proteins from whey. Food Bioprod. Process. 99, 156-165 (2016).
17. Li, Y. & Shahbazi, A. Lactic Acid Recovery From Cheese Whey Fermentation Broth Using Combined Ultrafiltration and Nanofiltration Membranes. Appl. Biochem. Biotechnol. 129-132, 985-996 (2006).
18. Colomban, A., Roger, L. & Boyaval, P. Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration, and cell recycling. Biotechnol. Bioeng. 42, 1091-1098 (1993).
19. Jedrzejewska, M. & Kozak, K. Ethanol production from whey permeate in a continuous anaerobic bioreactor by Kluyveromyces marxianus. Environ. Technol. 32, 37-42 (2011).
20. Lavari, L., Páez, R., Cuatrin, A., Reinheimer, J. & Vinderola, G. Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli. J. Dairy Res. 81, 267-74 (2014).
21. Golowczyc, M. et al. Use of whey permeate containing in situ synthesised galacto-oligosaccharides for the growth and preservation of Lactobacillus plantarum. J. Dairy Res. 80, 374-81 (2013).
22. Padilla, B. et al. Production of lactulose oligosaccharides by isomerisation of transgalactosylated cheese whey permeate obtained by β -galactosidases from dairy Kluyveromyces. J. Dairy Res. 82, 356-364 (2015).
23. Geiger, B. et al. From by-product to valuable components: Efficient enzymatic conversion of lactose in whey using β -galactosidase from Streptococcus thermophilus. Biochem. Eng. J. 116, 45-53 (2016).
24. Guimarães, P. M. R., Teixeira, J. A. & Domingues, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. Biotechnology Advances 28, 375-384 (2010).
25. Peters, R. H. Economic aspects of cheese making as influenced by whey processing options. in International Dairy Journal 15, 537-545 (2005).
26. Koutinas, A. A. et al. Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. Bioresour. Technol. 100, 3734-3739 (2009).
27. Gonzalez Siso, M. I. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. Bioresource Technology 57, 1-11 (1996).
28. Kotoupas, A., Rigas, F. & Chalaris, M. Computer-aided process design, economic evaluation and environmental impact assessment for treatment of cheese whey wastewater. Desalination 213, 238-252 (2007).
29. Ramos, O. L. et al. Whey and Whey Powders: Production and Uses. Encycl. Food Heal. 5, 498-505 (2016).
30. Sp?lu (Vicol), C. Biotechnological valorisation of whey. Innov. Rom. Food Biotechnol. 10, 1-8 (2012).
31. Bednarski, W. Possibilities for whey utilization. Przem. Ferment. i Owocowo-Warzywny 32, 14-17 (1988).
32. Grosu, L. et al. Valorization of whey from dairy industry for agricultural use as fertiliser: Effects on plant germination and growth. Environ. Eng. Manag. J. 11, 2203-2210 (2012).
33. Smithers, G. W. et al. New Opportunities from the Isolation and Utilization of Whey Proteins. J. Dairy Sci. 79, 1454-1459 (1996).
34. Božani, R., Baruk, I. & Lisak, K. Possibilities of whey utilisation. J. Nutr. Food Sci. 2, 1-7 (2014).
35. Jayaprakasha, H. M. & Brueckner, H. Whey Protein Concentrate: A Potential Functional Ingredient for Food Industry. J. Food Sci. Technol. 36, 189-204 (1999).
36. Jeewanthi, R. K. C., Lee, N.-K. & Paik, H.-D. Improved Functional Characteristics of Whey Protein Hydrolysates in Food Industry. Korean J. Food Sci. Anim. Resour. 35, 350-359 (2015).

37. Gernigon, G., Schuck, P., Jeantet, R. & Burling, H. in *Encyclopedia of Dairy Sciences* 738–743 (2011). doi:10.1016/B978-0-12-374407-4.00496-9
38. Ramchandran, L. & Vasiljevic, T. in *Membrane Processing: Dairy and Beverage Applications* 193–207 (2012). doi:10.1002/9781118457009.ch9
39. Kjaergaard-Jensen, G. & Oxlund, J. K. in *Trends in Utilization of Whey and Whey Derivatives* 21 (Bull. 233, IDF, 1988).
40. Mawson, A. J. *Bioconversions for whey utilization and waste abatement*. *Bioresour. Technol.* 47, 195–203 (1994).
41. Booi, C. J. Use of lactose in the pharmaceutical and chemical industry. *J. Soc. Dairy Technol.* 38, 105–109 (1985).
42. Zadow, J. G. Lactose: Properties and Uses. *J. Dairy Sci.* 67, 2654–2679 (1984).
43. Paterson, A. H. J. in *Advanced Dairy Chemistry* 3, 105–120 (2009).
44. Wee, Y., Kim, J. & Ryu, H. *Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications*. *Food Technology and Biotechnology* 44, 163–172 (2006).
45. Litchfield, J. H. in *Encyclopedia of Microbiology* 362–372 (2009). doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00151-6
46. Wasewar, K. L. Separation of Lactic Acid?: Recent Advances. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 19, 159–172 (2005).
47. Roukas, T. & Kotzekidou, P. Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus Zactis* cells using fedbatch culture. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 199–204 (1998).
48. Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N. & Bunko, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* 105, 1–14 (2007).
49. Fuquay, J. W. & Jelen, P. in *Encyclopedia of Dairy Sciences* 731–737 (2011). doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00495-7
50. Alvarez, M. M., Aguirre-Ezkauriatza, E. J., Ramírez-Medrano, A. & Rodríguez-Sánchez, Á. Kinetic analysis and mathematical modeling of growth and lactic acid production of *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* in milk whey. *J. Dairy Sci.* 93, 5552–5560 (2010).
51. Stieber, R. W. & Gerhardt, P. Continuous Process for Ammonium-Lactate Fermentation of Deproteinized Whey. *J. Dairy Sci.* 62, 1558–1566 (1979).
52. Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Knill, C. J. & Kosseva, M. Production of L(+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from Whey. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 53, 219–226 (2010).
53. Norton, S., Lacroix, C. & Vuilleumard, J. C. Kinetic study of continuous whey permeate fermentation by immobilized *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. *Enzyme and Microbial Technology* 16, 457–466 (1994).
54. Roukas, T. & Kotzekidou, P. Production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells. *Enzyme Microb. Technol.* 13, 33–38 (1991).
55. Kosseva, M. R., Panesar, P. S., Kaur, G. & Kennedy, J. F. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. *International Journal of Biological Macromolecules* 45, 437–447 (2009).
56. Aguirre-Ezkauriatza, E. J., Aguilar-Yáñez, J. M., Ramírez-Medrano, A. & Alvarez, M. M. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. *Bioresour. Technol.* 101, 2837–2844 (2010).
57. Fooks, L. J., Fuller, R. & Gibson, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int. Dairy J.* 9, 53–61 (1999).
58. Chen, L. A. & Sears, C. L. in *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* 1, 19–25 (2014).
59. Babu, M. production of single cell protein using *Kluyveromyces marxianus* isolated from paneer whey. *Int. J. Biomed. Adv. Res.* 5, 79–80 (2014).
60. Koushki, M., Jafari, M. & Azizi, M. Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains. *J. Food Sci. Technol.* 49, 614–619 (2012).
61. Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C. & Gombert, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 339–354 (2008).
62. Lane, M. M. & Morrissey, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews* 24, 17–26 (2010).
63. Gabardo, S., Rech, R., Rosa, C. A. & Ayub, M. A. Z. Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. *Renew. Energy* 69, 89–96 (2014).
64. Gupta, A. & Srivastava, A. K. Continuous Propionic Acid Production from Cheese Whey Using In Situ Spin Filter. *Biotechnol. Bioprocess Eng* 6, 1–5 (2001).
65. Jain, D. K., Tyagi, R. D., Kluepfel, D. & Agbebevi, T. J. Production of propionic acid from whey ultrafiltrate by immobilized cells of *Propionibacterium shermanii* in batch process. *Process Biochem.* 26, 217–223 (1991).
66. Alam, S., Stevens, D. & Bajpai, R. Production of butyric acid by batch fermentation of cheese whey with *Clostridium beijerinckii*. *J. Ind. Microbiol.* 2, 359–364 (1988).
67. Arslan, N. P., Aydogan, M. N. & Taskin, M. Citric acid production from partly deproteinized whey under non-sterile culture conditions using immobilized cells of lactose-positive and cold-adapted *Yarrowia lipolytica* B9. *J. Biotechnol.* 231, 32–39 (2016).
68. Raganati, F. et al. Butanol production by bioconversion of cheese whey in a continuous packed bed reactor. *Bioresour. Technol.* 138, 259–265 (2013).
69. Qureshi, N., Friedl, A. & Maddox, I. S. Butanol production from concentrated lactose/whey permeate: Use of pervaporation membrane to recover and concentrate product. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 9859–9867 (2014).
70. Farnworth, E. R. Kefir – a complex probiotic. *Food Sci. Technol. Bull. Funct. Foods* 2, 1–17 (2005).
71. Nielsen, B., Gürakan, G. C. & Ünlü, G. Kefir: A Multifaceted Fermented Dairy Product. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 6, 123–135 (2014).
72. Gradova, N. B., Khokhlicheva, A. A., Murzina, E. D. & Myasoyedova, V. V. Microbial components of kefir grains as exopolysaccharide kefir producers. *Appl. Biochem. Microbiol.* 51, 873–880 (2015).
73. Frengova, G. I., Simova, E. D., Beshkova, D. M. & Simov, Z. I. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 57, 805–810 (2002).
74. Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S. & Kitamura, S. Effects of an exopolysaccharide (kefir) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *Biofactors* 22, 197–200 (2004).
75. Rodrigues, K. L., Carvalho, J. C. T. & Schneedorf, J. M. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. *Inflammopharmacology* 13, 485–492 (2005).
76. Pop, C. et al. Influence of Different Growth Conditions on the Kefir Grains Production, used in the Kefiran Synthesis. *Bull. UASVM Food Sci. Technol.* 71, 2344–2344 (2014).
77. Yokoi, H. et al. Some taxonomical characteristics of encapsulated *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grains and characterization of its extracellular polysaccharide. *Int. J. Food Microbiol.* 13, 257–264 (1991).
78. Piermaria, J. A., de la Canal, M. L. & Abraham, A. G. Gelling properties of kefir, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocoll.* 22, 1520–1527 (2008).
79. Shahabi-Ghahfarrokhi, I., Khodaiyan, F., Mousavi, M. & Yousefi, H. Effect of γ -irradiation on the physical and mechanical properties of kefir biopolymer film. *Int. J. Biol. Macromol.* 74, 343–350 (2015).
80. Piermaria, J. et al. Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocoll.* 25, 1261–1269 (2011).
81. Dailin, D. J. et al. Bioprocess development for kefir production by *Lactobacillus kefirifaciens* in semi industrial scale bioreactor. *Saudi J. Biol. Sci.* 23, 495–502 (2016).

82. Illanes, A. in *Lactose-Derived Prebiotics: A Process Perspective* 1–33 (2016). doi:10.1016/B978-0-12-802724-0.00001-9
83. Vera, C., Guerrero, C., Conejeros, R. & Illanes, A. Synthesis of galacto-oligosaccharides by Beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. *Enzyme Microb. Technol.* 50, 188–194 (2012).
84. Fischer, C. & Kleinschmidt, T. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *Int. Dairy J.* 48, 15–22 (2015).
85. Kovacs, Z. et al. Recent developments in manufacturing oligosaccharides with prebiotic functions. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 143, 257–295 (2013).
86. Torres, D. P. M., Gonçalves, M. do P. F., Teixeira, J. A. & Rodrigues, L. R. Galacto-Oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9, 438–454 (2010).
87. Scott, F., Vera, C. & Conejeros, R. Chapter 7 – Technical and Economic Analysis of Industrial Production of Lactose-Derived Prebiotics With Focus on Galacto-Oligosaccharides. *Lactose-Derived Prebiotics* (2016). doi:10.1016/B978-0-12-802724-0.00007-X

88. Neto, H. B. D. A. et al. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 4, 1–6 (2009).
89. Rodríguez Colinas. obtención enzimática, caracterización y propiedades prebióticas de oligosacáridos empleados en leches infantiles. (Universidad Autónoma de Madrid (UAM), 2013).
90. Petrides, D. *Bioprocess Design and Economics. Bioseparations Science and Engineering* (2013).
91. Peters, M. S. & Timmerhaus, K. D. Plant design and economics for chemical engineers. *Plant Design and Economics for Chemical Engineers* (2004).
92. Schultz, N., Chang, L., Hauck, A., Reuss, M. & Sydatk, C. Microbial production of single-cell protein from deproteinized whey concentrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 515–520 (2006).

Recibido: 21 julio 2017

Aprobado: 20 agosto 2017

#VACCINESWORK TO PROTECT INDIVIDUALS AND COMMUNITIES

Immunization is our shield against serious diseases.

When immunization rates are high, the wider community is protected including:

Infants who are too young to receive their vaccines.



Older adults at risk of serious diseases.

People who take medication that lowers their immune systems.



Check with your doctor that you are fully vaccinated.



World Health Organization

DNA fingerprinting

Huella Genética

David Garcia¹ and Karla Miño¹

DOI.10.21931/RB/2017.02.04.12

ABSTRACT

DNA is the hereditary material presents in all the cells of the body. This molecule presents some characterizes, as VNTR, unique present in different individual. This is a key in the development of some techniques, in this case DNA fingerprinting. This procedure has simple steps that we will review in this work. DNA fingerprinting technique has become an important tool for scientific research, we will review some applications in fields like forensic investigations and parentage testing, moreover how this technique has revolutionized and evolved in areas as Anthropological genetics, botany and zoology.

Keywords: DNA fingerprinting, forensic, parentage testing, botany, zoology.

RESUMEN

El ADN es el material hereditario presente en todas las células de nuestro cuerpo. Esta molécula posee algunas características como los VNTR, que son repeticiones de secuencias únicas para cada individuo. Esta característica ha sido la clave para el desarrollo de algunas técnicas de identificación como la huella genética. Este procedimiento tiene pasos simples que revisaremos en este trabajo. La huella genética se ha convertido en una herramienta útil para las investigaciones científicas y también ha sido usada en varios campos como las investigaciones forenses, pruebas de paternidad, genética antropológica, botánica y zoología. En este trabajo revisaremos como la huella genética ha revolucionado y evolucionado en las áreas mencionadas.

Palabras claves: huella genética, forense, prueba de paternidad, botánica, zoología.

Introduction

DNA, or deoxyribonucleic acid, is a complex molecule that contains all the information necessary to build and maintain an organism. It is the hereditary material. Every cell in the human body has the same DNA. The information of DNA is stored as a code constituted by four nitrogenous bases: Adenine (A), Thymine (T), Cytosine (C) and Guanine (G). The order or sequence of these bases determines the information available for building and maintaining an organism¹. The human genome size is about 3,107 megabases (Mb) but only about 1.2 percent of the total genome encodes for proteins, this is around 20,000 genes, while 98.8 percent is noncoding DNA^{2,3}, which means that do not encode proteins. Within this group we have, for example, a variable number of tandem repeats (VNTR), which are repeated sequences of 9 to 100 base pairs (bp), that play a key role in the elaboration of DNA fingerprinting. Knowing the main DNA characteristics, specificity is the key to the emergence of DNA analysis. Numerous other techniques used to determine biological markers, such as HLA and blood group substances, have been successfully applied for identification purposes. All are based on exclusion, where markers are tested until a difference is found. Other factors favoring DNA analysis include the small sample requirement, the ability to rapidly replicate a sequence a millionfold or more in vitro, and the relative stability of DNA. The point is that DNA analysis alone can be a definitive test. Once the technique becomes routine, there is little doubt that, provided a suitable specimen can be obtained, DNA fingerprinting will be the single best test for excluding a falsely associated individual⁴.

A brief history of DNA fingerprinting

In 1980, Wyman and White laid the foundations for the concept based on the observation of a polymorphic DNA locus characterized by a number of variable-length restriction fragments called restriction fragment length polymorphisms (RFLPs), which are specific sequences where restriction enzymes cleave the DNA. However, the history of DNA dates back to 1985 with the paper "Hypervariable Minisatellite Regions In Human DNA" written by Alec Jeffreys. Jeffreys and his coworkers were analyzing the human myoglobin gene when they discovered a region consisting of a 33-base-pair sequence repeated four times. This tandem repeat was referred to as a minisatellite and similar regions as hypervariable because the number of tandem repeats is variable both within a locus and between loci. In 1987, Nakamura coined the term variable number of tandem repeats (VNTR) to describe individual loci where alleles are composed of tandem repeats that vary in the number of core units. When DNA is isolated, cleaved with a specific enzyme, and hybridized under low-stringency conditions with a probe consisting of the core repeat, a complex ladder of DNA fragments is detected. This profile appears to be unique to each individual. Different core repeats were later isolated and used to produce a number of different probes useful for fingerprinting⁴. For that time, this technique was unknown but its potential was evident. DNA fingerprinting had its first application in 1985 in a case of parentage

¹Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay Tech

Autor de correspondencia: david.garcia@yachaytech.edu.ec

testing, actually a maternity test, with paternal DNA unavailable. In this unusual case, a mother with her little 13 years old son were arrested in the airport when they arrived in England from Ghana because the authorities thought that he was not her son. A DNA fingerprinting applied to both demonstrated that, effectively, they told the truth. The first application of DNA fingerprinting in forensic identification happened later that same year, in a case that beautifully exemplifies the power of DNA evidence to link crime-scenes, to exclude suspects, and to support convictions. A suspect was arrested for allegedly committing a double rape and suicide to 2 minors⁵. A DNA fingerprinting using a sample of semen left in the crime scene demonstrated that a man had been responsible for both crimes but it was not the arrested suspect. He was released and the real culprit was arrested. Nowadays, this technique is still used to create DNA profile of each individual in order to clarify some crimes or parentage testing⁶.

What is DNA fingerprinting?

In simple words, DNA Fingerprinting is the technology which is used to identify individuals on the basis of the molecular characteristics of the DNA⁷. More specific, this method uses VNTR because the number of bases and repeats within a locus is unique to each individual. For example, an individual can have in his genome the sequence gatagata and this repeats 10 times and another can have the same sequence but only repeats 5 times. The technique is used, as we have seen before, in parentage testing and forensic cases but it can be used for anthropological genetics, zoology, and botany among others disciplines. Importantly, the technique of DNA Fingerprinting is very sensitive, which means that it can also generate data even from half (partially) decomposed biological material⁷.

Procedure to create a DNA fingerprinting.

The steps involve others techniques used in Molecular Biology, such as polymerase chain reaction (PCR) and electrophoresis among others. The following are the steps to generate a DNA fingerprinting.

1. The DNA is extracted from the nuclei of any cell in the body.
2. The DNA molecules are broken with the help of enzyme restriction endonuclease (called chemical knife) that cuts them into fragments. The fragments of DNA also contain the VNTRs.
3. The fragments are separated according to size by gel electrophoresis in agarose gel.
4. The separated fragments of single-stranded DNA are transferred onto a nylon membrane. Radioactive DNA probes having repeated base sequences complementary to possible VNTRs are poured over the nylon membrane. Some of them will bind to the of single-stranded VNTRs. The method of hybridization of DNA with probes is called Southern Blotting.
5. The nylon membrane is washed to remove extra probes.
6. An X-ray film is exposed to the nylon membrane to mark the places where the radioactive DNA probes have bound to the DNA fragments. These places are marked as dark bands when X-ray film is developed. This is known as autoradiography.
7. The dark bands on X-ray film represent the DNA fingerprints (DNA profiles)⁵.

These steps are shown better in figure 1.

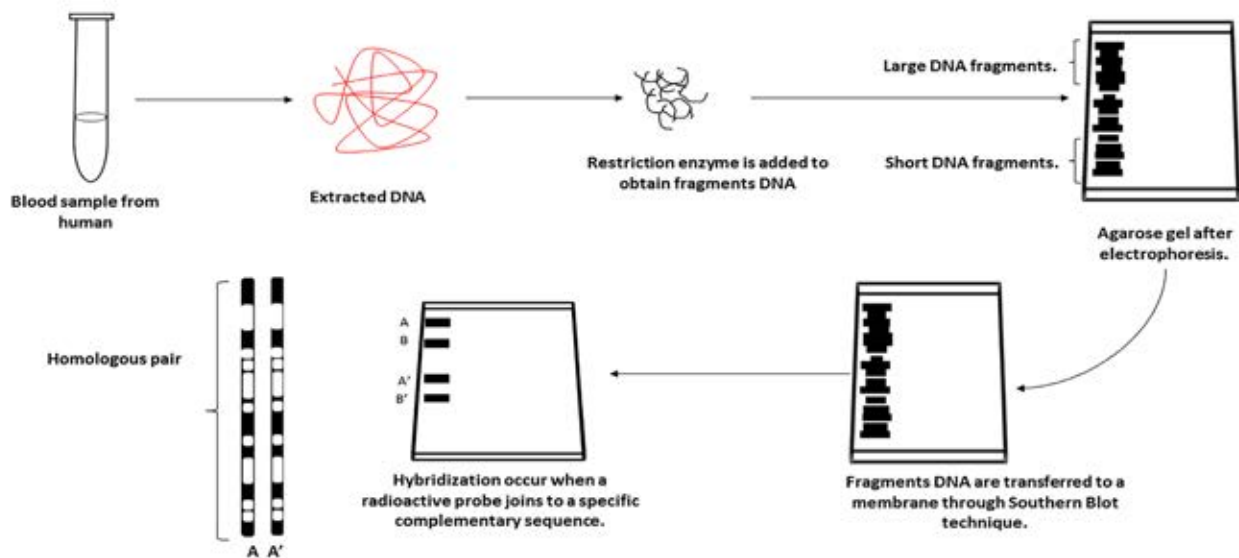


Figure 1. Schematic illustration of procedure in DNA fingerprinting

DNA Fingerprinting applications

Since Alec Jeffreys developed the DNA fingerprinting technique, it has been used in different scientific fields. In forensic investigations has helped to send to prison criminals, and identify victims of crimes, natural disaster, wars. Paternity disputes have been resolved thanks to this method. Moreover, disciplines as anthropological genetics, zoology, and botany among others have driven profiling research in order to interpret the origin and behavior of some species. In the next lines, we are going to describes how the technique has been applied and evolved in the areas mentioned above.

Forensic Investigations

Famous Crime T.V shows as CSI, Bones and others have popularized this technology. To summarize the methodology, genetic material like blood, semen, saliva, hair and skin found at the crime scene are processed, and afterward the samples are compared with the DNA of the suspects, in order to determine guilt or innocence of the accused.

DNA fingerprinting markers have evolved since 1984. In the beginning, sets of minisatellites or oligonucleotides stretches were used, also called multi-locus probes (MLP) which detected sets of 15 to 20 variable fragments per individual ranging from 3.5 to 20 kb in size. Minisatellites were replaced because they needed a large amount of molecular weight of DNA, usually not found at the crime scene and errors in the linkage between loci. For this reason was changed by single locus probe (SLP) which recognized single hypervariable locus, using high stringency hybridization and just 10 ng of DNA⁸.

Multilocus and Single Locus probes were part of the so-called restriction fragment length polymorphism (RFLP)-based methods were still limited by the available quality and quantity of the DNA. Those procedures were replaced by PCR-based methods because they improved sensitivity, speed, and genotyping precision. PCR-based methods use microsatellites as markers instead of minisatellites; microsatellites as short tandem repeats (STRs) are more sensitive and less prone to allelic dropout than VNTR (variable number of tandem repeat) systems⁸.

In cases, when there exist a low proportion of nuclear DNA samples, lineage marker is used which are obtained from mitochondrial and Y DNA, and they are very useful to reconstruct the paternal and maternal relationship and historical reconstruction in unidentified remains typically skeletonized, hair shafts without roots, or very old specimens where only degraded DNA is available likewise samples of sexual assault without ejaculation, sexual assault by a vasectomized male, male DNA under the fingernails of a victim, male 'touch' DNA on the skin⁸.

Parentage testing

DNA fingerprinting is an advantageous technique in cases, such as, of establishing the paternity of disputed offspring or cases of baby swapping. This method replaced ABO blood antigen systems which cannot establish paternity but can conclusively exclude an alleged father from being a candidate. Disputed paternity originates because of affiliation orders, divorce proceedings and questioned the legitimacy, also is used to discover paternity in cases of inheritance, guardianship, maintenance, legitimacy, adultery or fornication⁹.

In Parentage testing, a DNA comparison is performed between progeny against potential parents. Children inherit half of their alleles from each parent and thus should possess an alleles combination of their parents.

Anthropological genetics

In anthropological genetics, markers have been used as ancestry-informative markers to reconstruct the human diaspora and to interpret the evolutionary history of human populations to inquire population origins, migration, admixture and adaptation to different environments, as well as susceptibility and resistance to disease¹⁰.

The main markers used by anthropological genetic are variable-number tandem repeats (VNTRs), short tandem repeats (STRs), mitochondrial DNA haplo groups, Y-specific non-recombining region (NRY) haplotypes, and single nucleotide polymorphisms (SNPs).

In the medical field, researchers have made possible the mapping quantitative trait loci involved in biological pathways of diseases such as diabetes mellitus, cancers, obesity, osteoporosis, and coronary heart disease. In the studies of population, markers allow identifying the presence, absence, or high frequency in some populations and low frequencies in others, of certain genetic traits that characterize some specific population¹¹.

Botany

DNA fingerprinting is an essential tool for genotype identification in both wild plant and cultivated species. DNA profiling is used for protection of biodiversity, identifying markers for traits, identification of gene diversity and variation¹².

Identification in plants always been an issue for botanists because of the large variability of the composition and relative amount of chemicals in particular species of the plant varies with growing condition, harvesting period, post-harvesting period and storage conditions.

Due to large variability, DNA fingerprinting technique uses several types of markers for example, Inter Simple Sequence Repeat (ISSR), Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD)/Arbitrary Primed PCR, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), DNA Amplification Fingerprinting (DAF), Simple Sequence Repeats (SSR), Sequence Characterized Amplified Region (SCAR), Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) and Single Nucleotide Polymorphism (SNP)¹².

DNA markers help to study fundamental evolutionary influences of natural selection, mutation, gene flow and genetic drift on wild plant populations and identify groups are characterized by highly variable ploidy levels, often even within the same species. Moreover, the method detects both ancient and ongoing hybridization between crops and wild species¹².

Zoology

In Zoology, DNA fingerprinting determine the genetic identity of individuals and measure genetic variation in natural populations, allowing true genetic relationships among individuals to be determined, rather than them being inferred from field observations. Furthermore, it helps to test predictions of kin selection models in a realistically way, and detect hybrids species¹³.

The DNA marker clarified mating system in reproductive ecology for example in vertebrates that give birth to more than one offspring has revealed concurrent multiple paternities. This kind of behavior has been observed in a wide range of organisms, particularly in reptiles.

DNA microsatellites have been useful tools describing population connectivity, isolation, and the particulars of interpopulation gene flow, also now they are being used to document levels of genetic variation in rare and endangered species and thus better inform conservation management actions¹³.

Conclusions

DNA fingerprinting technique has become an important tool for scientific research, because it allows identifying patterns in the known coding region of genetic material that makes every individual unique, for that reason, areas as forensic investigations and parentage testing have found an instrument to convict criminals, identify victims, and solved parentage disputes.

Since Alec Jeffreys developed DNA fingerprinting technique in 1984, the technique has gone through for many adjustments, from southern blot to PCR methods, from minisatellites to microsatellites and new markers have been developed according to the needs of research fields for example in Anthropological genetics, botany, and zoology.

In the near future, we will be able to learn more about the dynamics of the history of the populations in humans and animals, discover new or hybrid species in plants and animal, besides knowing more about their genetic information.

References

1 U.S. National Library of Medicine. (2017, July 11). Genetics Home Reference. Retrieved from <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/basics/dna>

2 Alexander, R., Fang, G., Rozowsky, J., Snyder, M., & Gerstein, M. (2010, August). Nature Reviews Genetics. Retrieved from http://www.nature.com/nrg/journal/v11/n8/fig_tab/nrg2814_T2.html

3 Zimmer, C. (2015, March 5). The New York Times. Retrieved from <https://www.nytimes.com/2015/03/08/magazine/is-most-of-our-dna-garbage.html>

4 Kirby, L. (1993). DNA fingerprinting: an introduction. United Kingdom: Palgrave Macmillan.

5 Jobling, M. (2013). Curiosity in the genes: the DNA fingerprinting story. Investigative Genetics.

6 Matheson, S. (2016). DNA phenotyping: snapshot of a criminal. Cambridge.

7 Sethi, S., Hazari, P., Inderjeet, & Khare, R. (2016). DNA fingerprinting technology: and exhaustive review. India: Biochemiae acta.

8 Roewer, L. (2013). DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. Investigative genetics, 4(1), 22.

9 Mishra, A., Sathyan, S., & Shukla, S. K. (2015). Application of DNA Fingerprinting in an Alleged Case of Paternity. Biochemistry and Analytical Biochemistry, 4(2), 1.

10 Crawford, M. H., & Beaty, K. G. (2013). DNA fingerprinting in anthropological genetics: past, present, future. Investigative genetics, 4(1), 23.

11 Selvakumari, E., Jenifer, J., Priyadharshini, S., & Vinodhini, R. (2017). Application of DNA Fingerprinting for Plant Identification. Journal of Academia and Industrial Research (JAIR), 5(10), 149.

12 Nybom, H., Weising, K., & Rotter, B. (2014). DNA fingerprinting in botany: past, present, future. Investigative genetics, 5(1), 1.

13 Chambers, G. K., Curtis, C., Millar, C. D., Huynen, L., & Lambert, D. M. (2014). DNA fingerprinting in zoology: past, present, future. Investigative genetics, 5(1), 3.

Received: 18 July 2017

Approved: 29 November 2012

Gestione sus autores

¿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.



CERTIFÍQUESE EN ENSAYOS CLÍNICOS



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

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

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

Conferencias:

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

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

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

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

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

Conferencias:

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

- DISEÑO Y FASES DE LOS ENSAYOS CLÍNICOS

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

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

- DOCUMENTOS ESENCIALES PARA LA APROBACIÓN DE LOS ENSAYOS CLÍNICOS

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

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

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

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

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

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

GET TRAINED - GET CERTIFIED - GET WORKING

PERFIL DEL ESTUDIANTE:

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

...más información e inscripciones online <http://clinicalbiotec.com/cursos.html>

Biología

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  [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

