

# Bionatura

Solar erythemal irradiance in Ibarra, Ecuador  
Cytokines in the physiopathology of depression



mAbs against *Streptococcus pneumoniae*

Pathogenic microorganisms in urine samples

Degradación de materia orgánica en el Rio Negro. Colombia

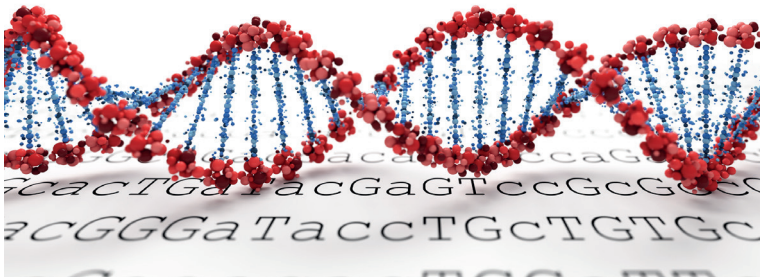
Ecuador ( Orquídeas nativas  
Hongos Micorrízicos Arbusculares  
Memorias de congresos versus artículos científicos

Ozonoterapia  
en hernias discales y en SIDA



[clinicalbiotec.com](http://clinicalbiotec.com)

# 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. Fernando Albericio. Ph.D. Full Professor. University of KwaZulu-Natal. Durban, South Africa  
 -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.  
 -Dr. Eduardo López Collazo. Director IdiPAZ Institute of Biomedical Research, La Paz Hospital, España.  
 Dr. Yovani Marrero-Ponce. Ph.D. Full Professor. Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Quito, Ecuador  
 -Dr. Manuel Limonta. Prof. PhD. Director: Regional Office for Latin American and the Caribbean International Council for Science (ICSU). Doctor honoris causa Autonomous Metropolitan University of México City (UAM). Dr. Honoris Causa - Universidad Central Ecuador. Dr.  
 -Dr. Michael Szardenings. PhD. Ligand Development Unit. Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology. Germany  
 -Dra. Luciana Dente. Research Professor University of Pisa, Italy.  
 -Dr. Dagoberto Castro Restrepo. PhD, Profesor / Director Research and Development. Catholic University of the East. Rionegro-Antioquia / Colombia  
 -Dr. Frank Alexis. Research / Full Professor. Yachay Tech University, Ecuador  
 -Dr. Si Amar Dahoumane. Research / Professor. Yachay Tech University, Ecuador  
 -Dr. Amit Chandra, MD, MSc, FACEP Global Health Specialist, Emergency Physician Millennium Challenge Corporation, London School of Economics and Political Science.  
 -Dr. Amina 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.  
 -Dr. Silvio e. Perea. PhD. Head of the Molecular Oncology Laboratory. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Cuba  
 -Dra. Daynet Sosa del Castillo. PhD. Directora del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador. CIBE-ESPOL  
 -Dra. Lilian Spencer. PhD. Profesora Investigadora. Universidad de Yachay Tech, Ecuador.  
 -Dra. Consuelo Macías Abraham. Especialista de II Grado en Inmunología, Investigadora y Profesora Titular, Doctora en Ciencias Médicas y Miembro Titular de la Academia de Ciencias de Cuba. Directora del Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), de La Habana, Cuba.  
 -Dr. 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. PhD. Profesora Investigadora. Universidad de Yachay Tech, Ecuador.  
 -Dr. Eduardo Penton. MD, PhD, Investigador Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba  
 -Dr. Julio Raúl Fernández Massó, PhD, Investigador Titular. Centro de

Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba

-Dr. Luis Trujillo. Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Ecuador.  
 -Dra. Lisset Hermida. Investigadora Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba  
 -Dr. Tirso Pons. Staff Scientist. Structural Biology and Biocomputing Programme (CNIO), España.  
 -Dr. Che Serguera. French Institute of Health and Medical Research. MIRcen, CEA, Fontenay-aux-Roses Paris, France  
 -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. 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. 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. Rolando Pajón. Associate Scientist, Meningococcal Pathogenesis and Vaccine Research. Center for Immunobiology and Vaccine Development, UCSF Benioff Children's Hospital Oakland", Estados Unidos.  
 -Dr. José Manuel Pais Chanfrau. Universidad Técnica del Norte, 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  
 -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. Celia Fernández Ortega. Investigadora Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Editora ejecutiva Biotecnología Aplicada. Cuba.  
 -Dra. Ligia Isabel Ayala Navarrete. Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Ecuador.  
 -Dr. Nalini kanta Sahoo, Professor & Head Department Marri Laxman Reddy Institute of Pharmacy. Hyderabad, Andhra Pradesh, India.

## 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/mbelvacouver.htm#ilustraciones%20\(figura\)](http://www.fisterra.com/recursos_web/mbelvacouver.htm#ilustraciones%20(figura))

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

El Comité Editorial de la Revista se reserva todos los derechos sobre los trabajos originales publicados en esta.

# Bionatura

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](mailto:editor@revistabionatura.com)

**ISSN:** 1390-9347 (Versión impresa)  
Formato: 21 x 29,7 cm

**ISSN:** 1390-9355 (Versión electrónica)  
Sitio web: <http://www.revistabionatura.com>

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

Instrucciones a los autores en:  
<http://revistabionatura.com/instrucciones.html>

Asistente de publicación / Publication assistant  
Evelyn Padilla Rodriguez ([sales@revistabionatura.com](mailto:sales@revistabionatura.com))

## EDITORIAL

- Genetically Modified Organisms. Importance in the current world 487  
*Organismos genéticamente modificados. Importancia en el mundo actual*  
Nelson Santiago Vispo

## LETTER TO EDITOR / CARTA AL EDITOR

- Negative effects of solar radiation on the skin 492  
*Efectos negativos de la radiación solar sobre la piel*  
Victor Santiago Padilla

## RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

- Solar erythmal irradiance in Ibarra, Ecuador (high altitude equatorial city). Ground and satellite measurements and model calculations 495  
*Erradiancia solar eritémica en Ibarra, Ecuador (ciudad ecuatorial de gran altitud). Mediciones terrestres y satelitales y cálculos con modelos*  
José M Huaca P, Graciela M. Salum, Rubén D. Piacentini
- Obtaining and characterization of monoclonal antibodies against capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1, 5, 6B, 14 and 19F 502  
*Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales contra polisacáridos capsulares de Streptococcus pneumoniae serotipo 1, 5, 6B, 14 y 19F*  
Fidel Ramírez Bencomo, Abel Fajardo Sánchez, Elizabeth González Aznar, Oscar Otero Alfaro, Rubén Cabrera Arias, Darcy Núñez Martínez, Reinaldo Acevedo Grogues
- Detection of pathogenic microorganisms in urine samples with BluBAC system 511  
*Detección de microorganismos patógenos en muestras de orina con sistema BluBAC*  
Nardo Ramírez-Frómata, Carlos Abel Lamothe-Nuviola, Elier Riverón-Rodríguez, Carmen Yamilet Moreno-Barrios, Angel Regueiro-Gómez
- Memorias de congresos versus artículos científicos: análisis del caso ecuatoriano 516  
*Conference proceedings versus articles: The Ecuadorian case analysis*  
José A. Castillo
- Presencia de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en especies representativas del bosque seco tropical del litoral ecuatoriano 524  
*Presence of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in representative species of the tropical dry forest of the Ecuadorian coast*  
Ivette Chiquito Noboa, Jaime Naranjo Morán & Milton Barcos-Arias

Análisis morfológico y morfométrico de semillas de tres especies de orquídeas nativas de la región neotropical del Ecuador <i>Morphological and morphometric analysis of seeds of three species of native orchids from the neotropical region of Ecuador</i> Vaca, I., Cueva, E. Moya, B., Acurio, D. , Chiluiza, V.	527
Evaluación de los Hongos Micorrízicos Arbusculares de zonas del trópico húmedo del Ecuador <i>Evaluation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi from humid tropical areas of Ecuador</i> Emy Moína-Quimí, Rodrigo Oviedo-Anchundia, Shayler Nieto-Barcelona, Paúl Herrera-Samaniego, Milton Barcos-Arias.	531
Determinación de coeficientes de degradación de materia orgánica en el rio Negro (municipio de rionegro, Colombia). <i>Determination of kinetics coefficients of organic matter degradation in negro river (municipality of rionegro, Colombia).</i> Carlos Augusto Benjumea Hoyo.	537
Ozonoterapia en hernias discales <i>Ozone therapy in herniated discs</i> Danilo Ruiz Reyes, María Elena Romo, Hugo Pereira Olmos.	544

## CASE REPORTS / REPORTE DE CASO

Ozonoterapia coadyuva al tratamiento antirretroviral del SIDA. Caso clínico <i>Ozone therapy contributes to the antiretroviral treatment of AIDS.</i> <i>Clinical case</i> Esteban Waliszewski Zamorano, Marco Antonio Conde Pérez, Daisy Irais Nava Morales.	549
---	-----

## REVIEW / ARTÍCULO DE REVISIÓN

Cytokines in the physiopathology of depression <i>Citoquinas en la fisiopatología de la depresión</i> María Belén Paredes, María Eugenia Sulen	552
--	-----

## NEWS AND VIEWS / NOTICIAS Y OPINIONES

Current methods of breast cancer diagnosis <i>Métodos actuales en el diagnóstico del cáncer de mama</i> Keila Gómez, Juan Carlos Laglaguano, Raúl Rodríguez	557
Four Ecuadorian students from Yachay Tech University invited to the Youth Winter Assembly 2018 Youth at the United Nations <i>Cuatro estudiantes ecuatorianos de la universidad Yachay Tech fueron invitados a la Youth Winter Assembly 2018 en las Naciones Unidas</i> Victor Manuel Santiago Padilla	561

La Revista Bionatura se encuentra indexada en:



Red Iberoamericana  
de Innovación y Conocimiento Científico



ResearchGate

y una copia online de la versión impresa en:



## EDITORIAL

# Genetically Modified Organisms. Importance in the current world.

## Organismos genéticamente modificados. Importancia en el mundo actual.

Nelson Santiago Vispo

DOI. 10.21931/RB/2018.03.01.1

488

The concept of sustainable development is the basis of a wide variety of international and national policies. The world population continues to expand 80 million people per year while the demand for natural resources continues to increase. Policies, treaties, and important goals underpin the notion of sustainable development. In this document, we discuss and test a variety of scientific literature related to the use of transgenic crops to achieve sustainable development objectives<sup>1</sup>.

There is a lot of pressure to not only expand the list of transgenic crops, and the percentage of their uses but also adding the possibility of marketing genetically modified animals. The main problem with the use of transgenic products is that, at present, the consequences of their consumption in humans in the short and long term are not really known. The use of genetically modified organisms (GMOs) increases companies' profits since the size of the plants can be greater (as the pests do not affect the crops are much larger and more abundant, etc.).

There are increasingly voices that demand not the elimination of these products, but rather more exhaustive and rigorous analyzes that ensure that they do not affect, or affect, the human being in the immediate future.

### Lets discuss then how GMO arise

Horizontal gene transfer (HGT) is the movement of genetic material between unicellular and/or multicellular organisms, which is not through vertical transmission (the transmission of DNA from parents to their offspring). It was first described in the 40s in microorganisms and 20 years later it has shown that it has a fundamental role in the adaptation to the environment of eukaryotic organisms, specifically in plants<sup>2</sup>.

The first rule in horizontal gene transfer seems to be to produce no damage, the genes that are integrated into the genome of another organism related or not, are often expressed at low levels and code for functions at the periphery of the host organism metabolism. However, these neutral acquisitions can provide novel combinations of genetic material so that natural selection can choose the best-adapted organisms. Sometimes, the transferred material evolves and produces a beneficial phenotype. In other cases, when the imported genes remain neutral and there is no obvious benefit associated with their retention, they are likely to be lost over time<sup>3</sup>.

Mankind has been altering the genomes of plants and animals for many years using traditional breeding techniques. Artificial selection for the desired specific traits has resulted in a variety of different organisms, ranging from the most pest-resistant corn to the different breeds of pets. But this artificial selection, in which organisms that exhibit specific traits are chosen to engender later generations, has been limited to natural variations. In recent decades, however, advances in the field of genetic engineering have allowed precise control over the genetic changes introduced into an organism. Today, we can incorporate new genes

from one species into a completely unrelated species through recombinant DNA techniques, optimizing agricultural yield or facilitating the production of valuable pharmaceutical substances. Farming plants, farm animals, and soil bacteria are some of the most prominent examples of organisms that have undergone genetic engineering<sup>4</sup>.

After the successful expression of the first recombinant proteins in bacteria and yeast, it became evident that numerous human proteins could not be produced efficiently using such systems because human proteins do not undergo post-translational modifications in bacterial cells, and The nature of the modifications in the yeast cells is different from those that take place in human cells such as for example glycosylation patterns. Furthermore, these expression systems cannot guarantee adequate folding of a series of human proteins, therefore, the research community faced the challenge of developing alternative expression systems capable of guaranteeing correct post-translational modifications. A simultaneous development of two technological models (based on transgenic animals and cultures of mammalian cells) was initiated giving, as a result, the first successful production of transgenic mammals<sup>5</sup>.

The first successful production of transgenic mammals by the microinjection of genetically modified constructs in the pronucleus of a mouse zygote was carried out more than 20 years ago<sup>6</sup>. In the US market UU for 2012, a total of 193 products were obtained using cultures of mammalian cells. This has been largely attributed to the fact that it was not until 2006 that the European Agency for the Evaluation of Medicines (EMA) approved antithrombin, the first recombinant protein derived from the milk of transgenic goats. This protein was later approved for commercialization by the United States Food and Drug Administration (FDA) as a medicine that prevents blood clotting in patients with hereditary antithrombin deficiency. In 2011, the EMA approved the use of the recombinant c1-esterase inhibitor produced in rabbits for the treatment of hereditary angioedema. The arrival on the market of the first therapeutic products produced with transgenic animals and their approval for medical use suggest that recombinant proteins could forge an important niche in biotechnology in the near future<sup>7</sup>.

Agricultural plants are one of the most cited examples of GMOs. Some benefits of genetic engineering in agriculture translate into higher yields, lower costs of food or drug production, less need for pesticides, higher nutrient composition, food quality, resistance to pests and diseases, greater food security and benefits doctors for the growing world population. Advances have also been made in the development of crops that mature faster and tolerate aluminum, boron, salt, iron, drought, frost and other environmental stressors, allowing plants to grow in conditions where they would not bloom. Several animals have also been genetically modified to increase yield and decrease susceptibility to disease. For example, salmon and tilapia have been designed to grow and mature faster and cattle have been improved to show resistance to mad cow disease<sup>8</sup>.

**Figure 1.** By Keith Weller, USDA - This image was released by the Agricultural Research Service, the research agency of the United States Department of Agriculture, with the ID K7743-13 (next), Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=185217>



The aquatic environment is connected to the surrounding agricultural landscapes, which regularly serve as sources of stressors such as agrochemicals. Genetically modified crops, which are grown on a large scale in many countries, can also act as stressors. Despite the commercial use of GMOs for over 20 years, its impact on the aquatic environment was only 10 years ago. The analysis of effects studies reveals that only a narrow range of organisms has been tested and that studies on the combinatorial actions of stressors are practically absent. The analysis of the destination studies shows that many aspects, such as the fate of leached toxins, the degradation of plant materials and the distribution of crop residues in the aquatic habitat, are not sufficiently investigated. Along with these research needs, we identify the standardization of test methods as a matter of high priority, both for research and for the evaluation of risks necessary for the regulation of GMOs<sup>9</sup>.

#### **History of international regulations for GMO research and development**

In 1971, the first debate about the risks to humans of exposure to GMOs began when a common intestinal microorganism, *E. coli*, became infected with DNA from a tumor-inducing virus<sup>10</sup>. Initially, safety issues were a concern for people working in laboratories with GMOs, and for nearby residents. However, the subsequent debate arose out of concern that recombinant organisms could be weapons. The growing debate, restricted to scientists, eventually spread to the public, and in 1974, the National Institutes of Health (NIH) established the Recombinant DNA Advisory Committee to address some of these problems.

In the 1980s, when deliberate releases of genetically modified organisms took place in the environment, the United States had few regulations in force. Adherence to the guidelines provided by the NIH was voluntary for the industry. Also during the 1980s, the use of transgenic plants was becoming a valuable effort for the production of new pharmaceutical products, and individual

companies, institutions, and countries saw biotechnology as a lucrative means of earning money. The worldwide commercialization of biotechnological products generated a new debate on the patentability of living organisms, the adverse effects of exposure to recombinant proteins, questions of confidentiality, the morality and credibility of scientists, the role of government in regulating science and other matters. In the USA the initiatives of the Technology Assessment Office of Congress were developed, which were adopted throughout the world as a top-down approach to advice policymakers in predicting the social impacts of GMOs.

Then, in 1986, a publication of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), called "Recombinant DNA Security Considerations," became the first intergovernmental document to address issues related to the use of GMOs. This document recommends that risk assessments should be carried out on a case-by-case basis. Since then, the case-by-case approach for risk assessment for genetically modified products has been widely accepted; however, the USA they have generally adopted a product-based evaluation approach, while the European approach is more process-based. Although in the past there was a lack of comprehensive regulation in many countries, governments around the world now meet public demands and apply more stringent testing and labeling requirements for genetically modified crops<sup>11,12</sup>.

In Ecuador, the commercialization of foods with transgenic content is restricted. The regulations apply both to products that come from abroad and to those that are made throughout the nation. Current regulations not only regulate their commercialization, but they also prohibit the experimentation, production, and cultivation of these organisms. The Ecuadorian Constitution, in its Article 14, states that the use of genetically modified organisms (transgenic) is prohibited since they harm human health and undermine food sovereignty. The restrictions on these organisms in Ecuador dates from 1999 when under the government of former



**Figure 2.** By International Rice Research Institute (IRRI) [CC BY 2.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>)], via Wikimedia Commons



President Jamil Mahuad, these regulations were established. Faced with this legal impediment, the only way to access these products was through imports. On August 18, 2000, through the Health Registration and Control Regulation, it was specified that only transgenic products with the approval of the Ministry of Health could enter the country<sup>13</sup>. That same year, through the Organic Law of Consumer Protection, the right of access to information on a transgenic product is established. The legal body stated: "If the products for human consumption or livestock to be commercialized have been obtained or improved through gene transplantation or in general genetic manipulation, this fact shall be noted on the product label, in highlighted letters." From this background, Ecuadorian laws have restricted the production and commercialization of transgenic through different regulations that have reinforced this intention over the last two decades<sup>14</sup>.

#### **Increased research and improved security go hand in hand**

Advocates of the use of GMOs believe, with proper research, these organisms can be traded safely. There are many experimental variations in the expression and control of modified genes that can be applied to minimize potential risks. Some of these practices are already necessary as a result of new legislation, such as avoiding the transfer of superfluous DNA (vector sequences) and replacing the selectable marker genes commonly used in the laboratory (antibiotic resistance) with harmless markers derived from plants<sup>12</sup>.

Issues such as no differentiating between the GMO and the regular plant could be overcome by incorporating identification factors, such as pigmentation, that facilitate the tracking and separation of genetically modified products from non-genetically modified products. Other incorporated control techniques include having inducible promoters (eg, stress-induced, chemicals, etc.), geographic isolation, using sterile male plants and separate growth stations<sup>4</sup>.

#### **Conclusions**

A considerable amount of evidence has accumulated since the first commercial crop of transgenic based products, suggesting that they can contribute to the three traditional pillars of sustainability, economics, environment, and society. As the world population continues to rise, the evidence reviewed here suggests that it would be unwise to ignore GMO crops as one tool that can help meet aspirations for sustainable global development.

GMOs benefit humanity when used for purposes such as increasing the availability and quality of food and medical care and contributing to a cleaner environment. If used wisely, they could improve the economy without causing more harm than good, and they could also take advantage of its potential to ease hunger and disease around the world. However, the full potential of GMOs cannot be realized without due diligence and attention to the risks associated with each new GMO on a case-by-case basis.

#### **Bibliographic references**

1. United Nations Development Programme (UNDP). Background of the Sustainable Development Goals | UNDP. 2017.<http://www.undp.org/content/undp/en/home/sustainable-development-goals/background.html> (accessed 17 May 2018).
2. Swithers KS, Soucy SM, Gogarten JP. The Role of Reticulate Evolution in Creating Innovation and Complexity. *Int J Evol Biol* 2012; 2012: 1–10.
3. Soucy SM, Huang J, Gogarten JP. Horizontal gene transfer: Building the web of life. *Nat Rev Genet* 2015; 16: 472–482.
4. Phillips BT, Write PD, Right S, Education N. Genetically Modified Organisms (GMOs): Transgenic Crops and Recombinant DNA Technology. 2014; : 1–7.ew targeted treatments for non-small cell lung cancer. *Mol Oncol*. 2009 Dec;3(5–6):409–24.

5. Yuan CL, Hu Y-C. A Transgenic Core Facility's Experience in Genome Editing Revolution. Springer, Cham, 2017, pp 75–90.
6. Stewart CL, Vanek M, Wagner EF. Expression of foreign genes from retroviral vectors in mouse teratocarcinoma chimaeras. *EMBO J* 1985; 4: 3701–9.
7. Maksimenko OG, Deykin a V, Khodarovich YM, Georgiev PG. Use of transgenic animals in biotechnology: prospects and problems. *Acta Naturae* 2013; 5: 33–46.
8. Human Genome Project Information. [https://web.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/index.shtml](https://web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/index.shtml) (accessed 17 May 2018).
9. Pott A, Otto M, Schulz R. Impact of genetically modified organisms on aquatic environments: Review of available data for the risk assessment. *Sci Total Environ* 2018; 635: 687–698.
10. Devos Y, Maesele P, Reheul D, Speybroeck L, Waele D. Ethics in the societal debate on genetically modified organisms: A (Re) quest for sense and sensibility. *J Agric Environ Ethics* 2008; 21: 29–61.
11. Takeda S, Matsuoka M. Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 444–457.
12. Ma JK-C, Drake PMW, Christou P. Genetic modification: The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 794–805.
13. Asamblea constituyente 2008: art. 1. Constitución Del Ecuador. *Const del Ecuador* 2008; : 218.
14. Congreso Nacional. Ley Orgánica De Defensa Del Consumidor. 2014

## LETTER TO EDITOR / CARTA AL EDITOR

### Negative effects of solar radiation on the skin. Efectos negativos de la radiación solar sobre la piel.

Victor Santiago Padilla

DOI. 10.21931/RB/2018.03.01.2

492

Skin cancer is the uncontrolled growth of abnormal skin cells. The problem occurs when there is irreparable damage to the DNA of skin cells and is most often caused by ultraviolet radiation from the sun or genetic defects that cause skin cells to multiply rapidly and form malignant tumors<sup>1</sup>. The most famous types of skin cancer are: melanoma which is the most lethal, and basal and squamous cell carcinomas are the most common<sup>2</sup>.

The main risk factors for melanoma are inheritance, the presence of atypical and asymmetric moles, large or numerous, and intense exposure to ultraviolet radiation (UV) or sunlight<sup>3</sup>. The basal cell carcinoma that is the most common cancer present in Caucasians, Hispanics, Chinese and Japanese Asians<sup>4</sup> along with the squamous cell carcinoma are mainly caused by cumulative exposure to ultraviolet (UV) rays throughout life<sup>5</sup>. This daily exposure over the year to ultraviolet light from the sun and intense exposure in the summer months means that about 90 percent of non-melanoma skin cancers are associated with exposure to ultraviolet (UV) radiation from the sun<sup>6</sup>.

UV radiation is one of the main components in the development of skin cancer, so the increase in these radiations would suppose a proportional increase in cancer cases. One of the factors in the increase in radiation is the height of the sun in the sky, the higher this is higher radiation will be, so this factor tends to increase according to the seasons and the time of the day being the summer months and the midday the points with the highest recorded incidence. Another factor is latitude, with the areas closest to the equator receiving the most radiation from the sun. At higher altitudes the thinner layers of the atmosphere filter less UV, with each 1000-meter increase in altitude, UV levels increase between 10% and 12%, making altitude another determining factor. In the article: Solar erythmal irradiance in Ibarra, Ecuador (high altitude equatorial city), ground and satellite measurements and model calculations you can know more about the subject<sup>7</sup>.

There are several warning signs of skin cancer and the manifestations of this depend on the type of injury. All skin cancers have alterations in the size, shape or color of a mole or other skin lesion, the appearance of new growth on the skin or a sore that does not heal. Basal cell carcinoma may appear as a flat growth, or as a small, pink or red, translucent, shiny area that may bleed after a mild injury. Squamous cell carcinoma may appear as a growing lump, often with a rough surface, or as a flat, reddish patch that grows slowly. Alterations that progress during a month or more must be evaluated by a specialist to avoid major risks<sup>8</sup>.

The best way to detect skin cancer in its initial stages is to know the new or changing skin growths, especially those that seem unusual. Any new injury, or a progressive change in the appearance of an injury, should be evaluated by a doctor. Most early stages of skin cancers are diagnosed and treated by removing and microscopically examining the cells. The best way to treat most skin cancers begins with a diagnosis of this in its first stages and treat it by extraction with minor surgeries or other techniques, the microscopic examination of the ex-

tracted cells and in some cases can be used radiotherapy and certain topical medications. The majority of non-melanoma cancer cases can be cured, especially if the cancer is detected and treated with adequate time. Melanoma cases are also highly curable when detected in their early stages otherwise it is more likely to spread to other parts of the body. The 5-year relative survival rate is 99% for the localized stage, 63% for the regional stage and 20% for the distant stage disease<sup>8</sup>.

The effects produced by intense ultraviolet radiation such as skin burns can be cumulative and increase over time so great care must be taken to prevent and with more care at early ages. These effects can be minimized by avoiding solar radiation as much as possible by wearing protective clothing such as long sleeves, pants, hats and sunglasses along with the application of sunscreens with a protection factor of 30 FPS or higher<sup>8</sup>.

#### Efectos negativos de la radiación solar sobre la piel.

El cáncer de piel es el crecimiento incontrolado de células anormales de la piel. Ocurre cuando hay daños irreparables en el ADN de las células de la piel y es causado con mayor frecuencia por la radiación ultravioleta del sol o defectos genéticos que hacen que las células de la piel se multipliquen rápidamente y formen tumores malignos<sup>1</sup>. Los tipos de cáncer de piel más famosos son el melanoma por ser el más letal y los carcinomas de células basales y escamosas por ser los más comunes<sup>2</sup>.

Los principales factores de riesgo de melanoma son antecedentes familiares de melanoma, la presencia de lunares atípicos y asimétricos, grandes o numerosos y la exposición intensa a la radiación ultravioleta (UV) o luz solar<sup>3</sup>. El carcinoma de células basales que es el cáncer más común presente en caucásicos, hispanos, asiáticos chinos y japoneses<sup>4</sup> junto con el de células escamosas son causados principalmente por la exposición acumulativa a los rayos ultravioleta (UV) a lo largo de la vida<sup>5</sup>. Esta exposición diaria durante todo el año a la luz ultravioleta del sol y la exposición intensa en los meses de verano hacen que alrededor del 90 por ciento de los cánceres de piel no melanoma están asociados con la exposición a la radiación ultravioleta (UV) del sol<sup>6</sup>.

La radiación UV es uno de los componentes principales en el desarrollo del cáncer de piel por lo que el aumento de estas radiaciones supondría un aumento proporcional en los casos de cáncer. Uno de los factores en el aumento de las radiaciones es la altura del sol en el cielo, mientras más alto este se encuentre más alta será la radiación por lo que este factor se encuentra sujeto a aumentar de acuerdo con las épocas del año y las horas del día siendo los meses de verano y el medio día los puntos de mayor incidencia registrada. Otro factor es latitud, siendo las zonas más cercanas al Ecuador las que reciben mayor radiación del sol. Al mismo tiempo a mayor altitud las capas más delgadas de la atmósfera filtran menos UV, con cada aumento de 1000 metros de altitud los niveles de UV aumentan entre un 10% y un 12% haciendo que la altitud sea otro factor determinante. En el artículo Irradiancia solar eritémica en Ibarra, Ecuador (ciudad ecuatorial de gran altitud). Mediciones terrestres y satelitales y cálculos con modelos podrá conocer más acerca del tema<sup>7</sup>.

Son varias las señales de advertencia de cáncer de piel y las

manifestaciones de esta dependen del tipo de lesión. Todos los cánceres de piel presentan alteraciones en el tamaño, forma o color de un lunar u otra lesión en la piel, la aparición de un nuevo crecimiento en la piel o una llaga que no cicatriza. El carcinoma de células basales puede aparecer como un crecimiento plano, o como un área pequeña, rosada o roja, translúcida y brillante que puede sangrar después de una lesión leve. El carcinoma de células escamosas puede aparecer como un bulto creciente, a menudo con una superficie áspera, o como un parche plano y rojizo que crece lentamente. Las alteraciones que progresan durante un mes o más deben ser evaluadas por un especialista para evitar riesgos mayores<sup>8</sup>.

La mejor forma de detectar el cáncer de piel en sus etapas iniciales es conocer los crecimientos nuevos o cambiantes de la piel, especialmente aquellos que parecen inusuales. Cualquier nueva lesión, o un cambio progresivo en el aspecto de una lesión debe ser evaluada rápidamente por un médico. La mejor forma de tratar la mayoría de los cánceres de piel comienza con un diagnóstico de este en sus primeros estados y tratarlo mediante extracción con cirugías menores u otras técnicas, el examen microscópico de las células extraídas y en algunos casos se pueden usar radioterapia y ciertos medicamentos tópicos. La gran mayoría de los casos de cáncer de tipo no melanoma se pueden curar, especialmente si el cáncer se detecta y trata con el tiempo adecuado. Los casos de melanoma también son altamente curables cuando se detecta en sus primeras etapas de no ser así es más probable que se extienda a otras partes del cuerpo. La tasa de supervivencia relativa a 5 años es del 99% para el estadio localizado, del 63% para el estadio regional y del 20% para la enfermedad en etapa distante<sup>8</sup>.

Los efectos producidos por la intensa radiación ultravioleta como quemaduras en la piel pueden ser acumulativos y aumentar con el tiempo por lo que se debe tener un gran cuidado de presentar lesiones debido al sol desde temprana edad. Estos efectos se pueden minimizar evitando la radiación solar lo más posible mediante el uso de prendas protectoras como mangas largas, pantalones, sombreros y gafas de sol es de gran importancia junto con la aplicación de protectores solares con un factor de protección de 30 FPS o mayor<sup>8</sup>.

## Bibliographic references

1. Skin Cancer Information - SkinCancer.org [Internet]. Skincancer.org. 2018 [cited 15 March 2018]. Available from: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information>
2. Melanoma - SkinCancer.org [Internet]. Skincancer.org. 2018 [cited 15 March 2018]. Available from: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma>
3. Alpana K Gupta R. Skin Cancer Concerns in People of Color: Risk Factors and Prevention [Internet]. PubMed Central (PMC). 2016 [cited 15 March 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5454668/>
4. Basal Cell Carcinoma (BCC) - SkinCancer.org [Internet]. Skincancer.org. 2018 [cited 15 March 2018]. Available from: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/basal-cell-carcinoma>
5. Skin Cancer Facts & Statistics - SkinCancer.org [Internet]. Skincancer.org. 2018 [cited 15 March 2018]. Available from: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/skin-cancer-facts>
6. Ultraviolet radiation and health [Internet]. World Health Organization. 2018 [cited 15 March 2018]. Available from: [http://www.who.int/uv/uv\\_and\\_health/en/](http://www.who.int/uv/uv_and_health/en/)
7. Huaca P. J, Salum G, Piacentini R. Solar erythema irradiance in Ibarra, Ecuador (high altitude equatorial city). Ground and satellite measurements and model calculations. *Bionatura*. 2018;3(1).
8. Cancer Facts & Figures 2018 [Internet]. Atlanta: American Cancer Society; 2018 [cited 15 March 2018]. Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2018/cancer-facts-and-figures-2018.pdf>



## RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

# Solar erythemal irradiance in Ibarra, Ecuador (high altitude equatorial city). Ground and satellite measurements and model calculations Irradiancia solar eritémica en Ibarra, Ecuador (ciudad ecuatorial de gran altitud). Mediciones terrestres y satelitales y cálculos con modelos

José M Huaca P<sup>1</sup>, Graciela M. Salum<sup>2</sup>, Rubén D. Piacentini<sup>3,4</sup>

DOI: 10.21931/RB/2018.03.01.3

**Abstract:** The knowledge of the UV Index values, as an indicator of solar risk, allows us to adopt appropriate protection measures. This research analyzes the erythemal irradiance (directly linked with the UV Index) from July to September 2017 measured in Ibarra, Ecuador with a UV radiometer. We found that 72 days hold UVI values higher than 11 over 82 measured days, i.e. there are stages in 87.8% of the days when the UVI overcome the "extreme" value (according the WMO and WHO classification). Also, 14 days show UVI values over 20 (extremely high). Such classification doesn't seem quite adequate for this particular region. This region has important characteristics that increase the UVI: high altitude (2225 m a.s.l.), low atmospheric ozone values (248.8±12.2 DU measured from 2005 to 2016 by OMI/NASA satellite), and great cloudiness percentage (with an annual average value of 78.5%) of "cumulus" type. This study demonstrated the need for skin protection for individuals who perform outdoor activities in Ibarra, a place considered "high risk" for skin damage progression due to its high altitude and closeness to the equator, even under cloudy skies.

**Key words:** Solar risk, UV Index, clouds, Ibarra, Ecuador

**Resumen:** El conocimiento de los valores del Índice UV, como indicador de riesgo solar, nos permite adoptar medidas de protección apropiadas. Esta investigación analiza la irradiancia eritémica (directamente vinculada con el Índice UV) desde Julio hasta Septiembre de 2017 medida en Ibarra, Ecuador con un radiómetro UV. Encontramos que 72 días tienen valores de IUV más altos que 11 sobre 82 días medidos, es decir que 87.8% de los días tienen fases donde el IUV sobrepasa el valor "extremo" (de acuerdo a la clasificación de la OMM y la OMS). También, 14 días tienen valores de IUV por sobre 20 (extremamente alto). Esta clasificación no parece ser muy adecuada para esta región particular. Esta región tiene importantes características que incrementan el IUV: gran altitud (2225 m s.n.m.), bajos valores de ozono atmosférico (248.8±12.2 UD medido en el periodo 2005-2016 por el satélite OMI/NASA), y gran porcentaje de nubosidad (con valor promedio anual de 78.5%) de nubes de tipo "cúmulos". Este trabajo demostró la necesidad de protección de la piel para personas que desarrollan actividades externas en Ibarra, que es un sitio considerado de "alto riesgo" para la progresión de daño en la piel, debido a su gran altitud y cercanía de la línea ecuatorial, aún bajo días nublados.

**Palabras clave:** Riesgo solar, Índice UV, nubes, Ibarra, Ecuador

495

## Introduction

The Sun, located 150 million kilometers from Earth, emits electromagnetic radiation whose spectrum covers several wavelengths, ranging from microwaves to gamma rays. Fortunately, life is possible as we know it, since the terrestrial atmosphere filters most of these radiations, preventing any powerful solar ultraviolet radiation (UVR) from reaching the terrestrial surface level, as well as X and gamma radiations.

UVR is usually subdivided into three bands: UVA (400–315 nm), UVB (315–280 nm) and UVC (280–100 nm). UVR at wavelengths shorter than 320 nm is more photo-biologically active than UVR at longer wavelengths<sup>1</sup>. Accordingly, radiation from 250 nm is biologically active to cause erythema (a skin condition characterized by redness) in the skin. Therefore, UVA penetrates the human skin more deeply than UVB resulting in greater risk for initiation of the carcinogenic process in skin<sup>2</sup>.

Stratospheric ozone is the main absorber in the atmosphere which determines the amount of UVR that reaches the ground. Ozone production and destruction require solar radia-

tion with wavelengths shorter than 240 nm (which is mainly UVC radiation)<sup>3</sup>. Total column ozone is measured with ground and satellite-based instruments. A typical ozone value in the mid-latitudes is found in the region of 300 Dobson Unit (DU)<sup>4</sup>, where 1 DU = 2.69x10<sup>16</sup> mol O<sub>3</sub>/cm<sup>2</sup>. In the absence of all other factors, less ozone in the atmosphere allows for more solar UVB radiation to reach the ground, and vice versa. Among the myriads of elements that enables life on Earth, a crucial one is the impact the ozone layer plays on the decrease of this solar radiation<sup>5</sup>.

It's estimated that followed by stratospheric ozone, the percentage of cloudiness is the second most effective filter limiting the amount of solar UVR that reaches the Earth's surface. However, cloud cover can either attenuate or enhance the amount of solar UVR reaching the ground. Whether attenuation or enhancement occurs is determined by factors such as cloud location (which refers to cloud height and determining if the cloud is covering the solar disc). Other factors include opti-

<sup>1</sup> Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador

<sup>2</sup> School of Biological Science and Engineering, Yachay Tech University, Urcuquí, Ecuador

<sup>3</sup> Instituto de Física Rosario (CONICET – Universidad Nacional de Rosario), Rosario, Argentina

<sup>4</sup> Laboratorio de Eficiencia Energética, Sustentabilidad y Cambio Climático, IMAE, Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina

Correspondencia: Eng. José M Huaca P, Universidad Técnica del Norte, Av 17 de Julio 5-21, Ibarra, Ecuador. e-mail: jmhuaca@utn.edu.ec

cal thickness and liquid water content<sup>6</sup>. According to Juzenie et al.<sup>7</sup>, people burn less on a cloud-covered day or in winter. However, a distinctive situation occurs when the clouds are of cumulus-type close to (but not covering) the Sun: An enhancement follows and the terrestrial values of solar UV radiation overcomes the extraterrestrial (outside of Earth's atmosphere) UV radiation<sup>7</sup>. In particular, several investigations have found extreme values of solar terrestrial radiation in different places: Puna de Atacama, Argentina<sup>1</sup>; Ecuador<sup>2</sup>; Recife, Brazil<sup>3</sup>; San Pablo, Brazil<sup>6</sup>; Maceió, Brazil<sup>8</sup>. Salum et al.<sup>4</sup> analyzed the change of energy in one peak of enhanced total solar irradiance due to clouds.

Solar UV Index (UVI) is the time-dependent wavelength-weighted average effective UV irradiance in W/m<sup>2</sup> multiplied by 40 [m<sup>2</sup>/W]. The World Health Organization (WHO) and the World Meteorological Organization (WMO) made a classification of the UVI<sup>9</sup> (see Table 1). This classification has been

**Table 1.** UVI (ultraviolet index) proposed by WHO and WMO<sup>9</sup>.

UVI	Solar risk classification
0 = UVI < 2	Low
2 = UVI < 5	Moderate
5 = UVI < 7	High
7 = UVI < 11	Very High
UVI = 11	Extreme

the subject of critical analysis because the UVI in many parts of South America, and countries close to latitude 0° and high altitude, have values above 11<sup>10</sup>.

MED (or minimal erythemal dose) is the dose of UVR required to produce a barely perceptible erythema<sup>11</sup>. The effective UV spectrum is the mathematical product of the solar UV spectrum and the erythemal response spectrum. The effective UV intensity is the integral of the UV spectrum over the wavelength, and usually is measured in (MED/h) or UVI<sup>7</sup>. The action response spectrum is the relative response of each wavelength for causing some biological effect. Figure 1 shows the action response spectrum of erythemal action spectrum<sup>12</sup> and

SCUP (Skin Cancer Utrecht-Philadelphia) action spectrum<sup>13</sup>. The SCUP spectrum is used as a model of UV carcinogenesis of the skin. Figure 1 shows that the biggest response, for both effects, is in the UVB range. In these cases the UV Index is a

**Table 2.** Fitzpatrick's skin phototypes<sup>14</sup>.

Phototype	UVB MED (J/m <sup>2</sup> )
<b>I</b>	150-300
<b>II</b>	350-400
<b>III</b>	300-500
<b>IV</b>	400-600
<b>V</b>	600-900
<b>VI</b>	900-1500

good indicator for the skin cancer risk, too.

The MED values depend largely on the phototype of the skin. The skin classification (see Table 2) of Fitzpatrick is based on the color and the responses to sun exposure in terms of tanning and burning degrees<sup>14</sup>.

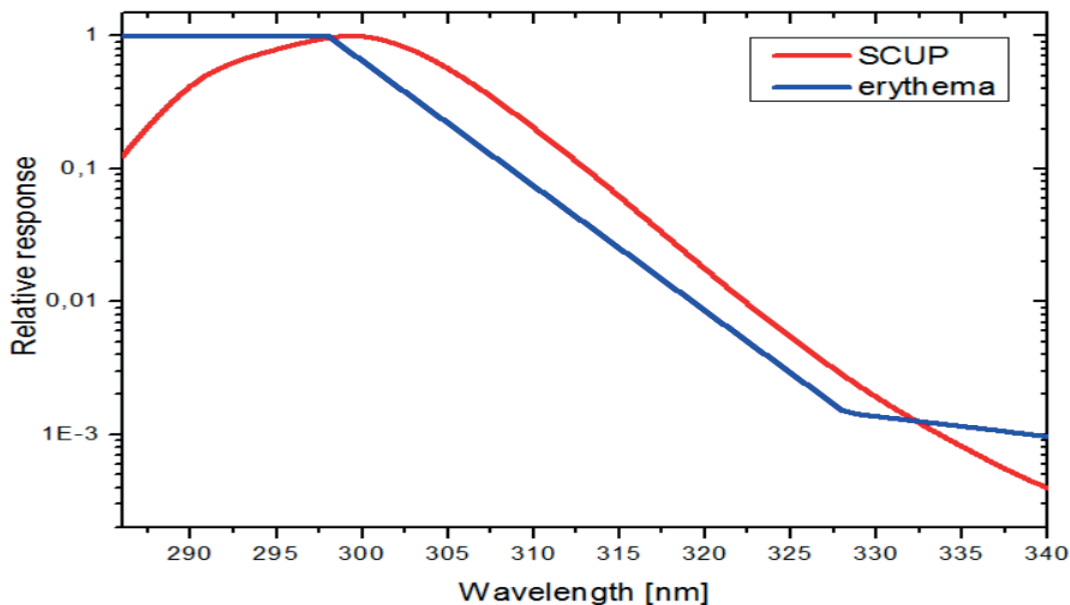
In the Bolivian Andes, at around 4000 m altitude, the UVI is the highest in the world, showing UVI above 16, and commonly reaching UVI values above 20. Measurements have been made in the desert of Arica in Chile, where it was observed that the increase in percentage of UV irradiance per 1000 m of altitude above sea level are 5.1% in summer and 5.8% in winter<sup>15</sup>.

In a recent publication, Holick<sup>16</sup> emphasized the importance of the biological effects of sunlight on health, linking the exposure to UVB radiation to brain activity, and a balance in the sun exposure needed to synthesize vitamin D and the sun exposure to produce sun burning.

## Methods

In this research we used a calibrated ultraviolet radiometer Erythemal-type, Kipp&Zonen. Once the data (in millivolts) were stored, they were converted to irradiance data (in watts per square meter). This radiometer (called biometer) was installed along with a data logger in Ibarra, Ecuador, (0.36° N,

**Figure 1.** Action spectrum of erythema<sup>12</sup> and Skin Cancer Utrecht-Philadelphia (SCUP) action spectrum<sup>13</sup>.



78.1° W, 2225 m a.s.l.), registering solar erythemal UV radiation each minute.

The data acquisition began in June 2017 and in this study data is presented for a period of three months: July, August and September. In order to determine the UV Index in Ibarra, we analyzed the data for (a few days of) clear sky days and some clouded days. Then, we compared days with clear skies and days with cloudy skies. We also considered the erythemal irradiances obtained from a satellite data base in order to compare the terrestrial and the satellite data. The UV Index information was obtained from measurements done by the OMI/KMNI instrument on board of the Aura/NASA satellite<sup>17</sup>.

In particular, we were looking for the days with higher UVI per month. For each selected day, we calculated the daily evolution of the UVI in clear sky situation with the TUV model<sup>18</sup>. This algorithm models the erythemal solar irradiance and UVI (among other variables) as a time function for certain input parameters. The most important parameters are: date, latitude and longitude, altitude, aerosol content (any solid or liquid particle suspended in the atmosphere), ozone content and albedo. The model consists of a set of parametric equations. These can calculate solar irradiance when applied to different layers of the atmosphere.

Afterwards, the values of the modeled irradiance (for clear sky) are compared with the actual value to determine impact of the clouds. Another comparison provides the surplus of energy caused by the increase in solar irradiance due to clouds.

## Results

### i- UV Index analysis

Once (the data was) converted to irradiance, we convert the irradiance data to UVI. In a first analysis, we identified the clear sky days (25% or less of cloudiness) for each month. We detected three days for July: 15<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup>, which we averaged to obtain a representative or "typical" clear sky day for that particular month. Figure 2 (top) shows the monthly measured evolution of the UVI data (gray line) and the representative clear sky day data for July 2017 (blue line).

It turned out that most days showed data above the representative day. This implies that the clouds do not always have an attenuating effect on solar radiation, but can also increase it. Figure 2 shows the oscillations of the UVI due to cloudiness.

In Figure 2, we also displayed the data for August (center) and September (bottom) 2017. In the same Figure, we included two lines that show a "very high" UV Index (orange line) or an "extreme" UV Index (red line), according to the WMO/WHO classification. In 82 measured days there were 72 days with UVI values higher than 11 which is considered for WMO and WHO "extreme UVI" (see Table 1). This means that 87.8% of the days have moments when the UVI exceeds the "extreme" value. Furthermore 14 days have UVI values over 20 (extremely high), corresponding to 17.1 % of the observed days. This classification doesn't seem optimal for this particular region (with mean population having a skin phototype of III and IV on the Fitzpatrick scale), as was recently proposed by Zaratti et al<sup>1</sup>.

Another source for the UV Index is the database from measurements done by the OMI/KMNI instrument on board of the Aura/NASA satellite<sup>17</sup>. We analyzed these data for Ibarra, Ecuador, from January 1, 2010, to December 31, 2016, see Figure 3. The mean value of the UV Index for the whole period is (11.0±2.0), a value which is in the "extreme" range, showing the

significance of the erythemal irradiance at this high altitude near the equator.

### ii- Cloud effect

One possible explanation for the high UV index values is the presence of clouds (cumulus type) that enhance the solar radiation owing to two combined effects: concentration of this radiation due to the cloud edges and multiple scattering because of dispersion in the cloud plane<sup>1</sup>. According to the SSE/NASA satellite data base<sup>19</sup>, Ibarra has an average monthly cloudiness of 70.9% in July, 72.7% in August and 80.5% in September, with an annual average value of 78.5%. Therefore the authors think that it is likely that this effect occurs in Ibarra. This enhancement is important for various forms of sun protection. The attenuation effect of solar radiation can be seen, for example, at 12:18 on September 9<sup>th</sup> when cloudiness caused a rapid fall in the UV Index from 17.1 (clear sky conditions) to a value of 5. This is equivalent to a decrease of 71.2% of the UVI.

### iii- Modeling of erythemal irradiance

During the three months of measurements, the days with highest UVI values for each month were: July 28, August 27 and September 3. These days are shown in Figure 4. The modeled UVI is in blue. This modelling was performed with the TUV model, as the UV Index was limited to the possibility of a clear sky day situation (taking in consideration the descending slope of the curve).

Analyzing September 3 data, for a clear sky situation, the UV Index turns out higher than 5 (lower limit of "high UVI") from 8:35 am to 3:48 pm (7.22 hours), higher than 7 (lower limit of "very high UVI") from 9 am to 3:24 pm (6.4 hours) and higher than 11 (lower limits of "extreme UVI") from 9:44 am to 2:39 pm (4.9 hours). This illustrates that the WMO/WHO classification is not valid for Ibarra. This is of interest, not only to the inhabitants of the region who have a phototype III or IV, but also to Caucasians or fair skinned people because skin cancer risk is higher than for phototype II and I<sup>24</sup>. Figure 4 shows the lower limits for "high", "very high" and "extreme" UV Index classification, according to WMO/WHO for the three days per month with higher UV Index.

In the case of September 3, the modelling clear sky situation was compared to the measured (real) condition between 12:46 pm and 1 pm (local hours = UT -5 hours). This interval is of interest since there is a peak due to the cloud condition. The measured value has a maximum UVI equal to 22.1 at 12:16 and the modeled value of 19.4 for the same time. This is an increase of 14.2%, with respect to clear sky conditions. This value (UV Index = 22.1) was the highest value in the analyzed months.

### iv- Energy analysis

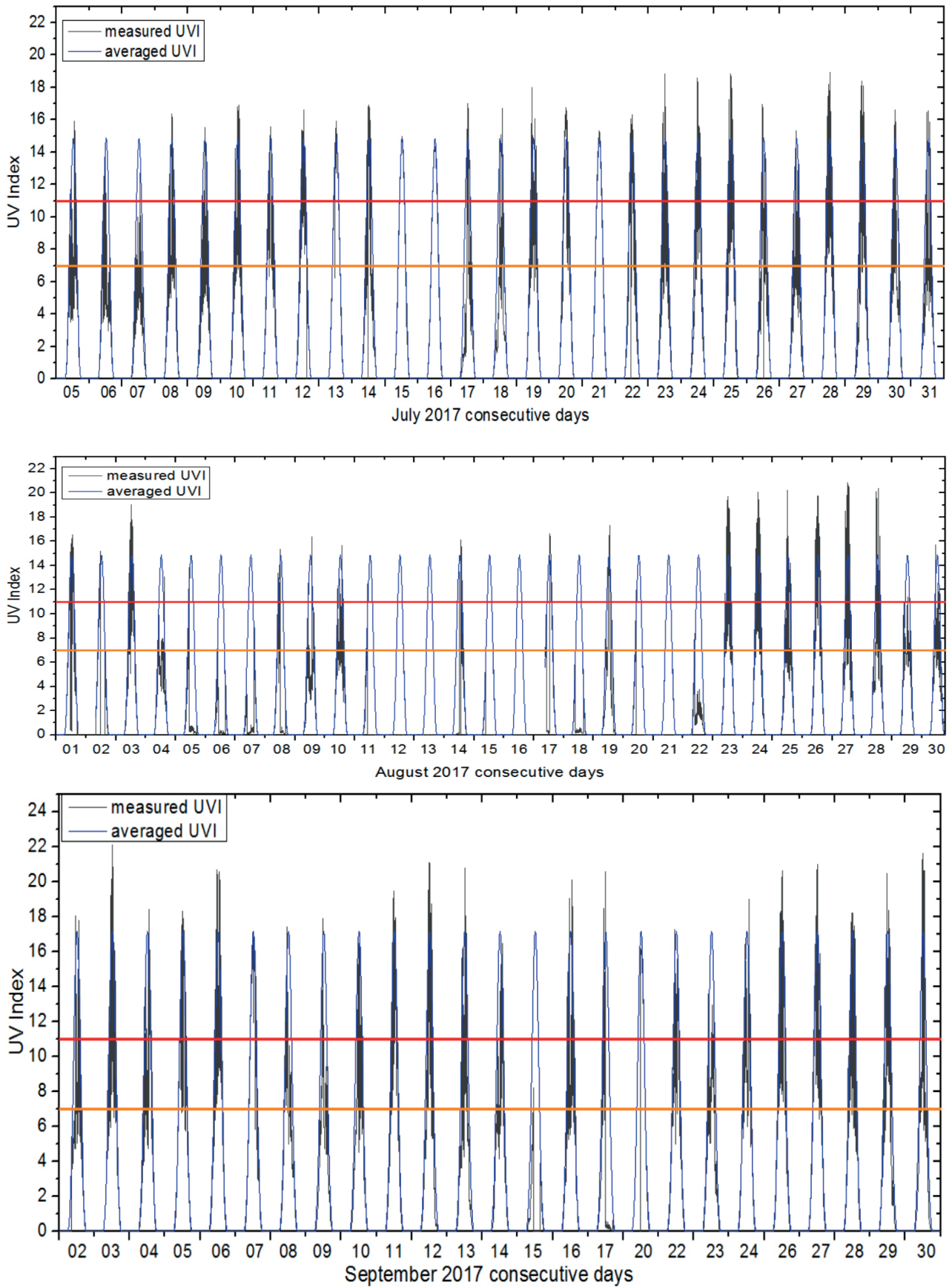
In order to determine the change of energy caused by this increase in solar irradiance due to clouds, we need to calculate the irradiation, -that corresponds to the integration (continuous sum) of irradiance, also called insolation. Before that step we must calculate the erythemal irradiance, which is the UV Index divided by 40 [m<sup>2</sup>/W].

For September 3, we integrated the erythemal irradiance between 12:46 pm and 1 pm. The results are: ETUV = 389.9[J/m<sup>2</sup>] and Ereal = 400.3[J/m<sup>2</sup>], or a difference of 2.7%.

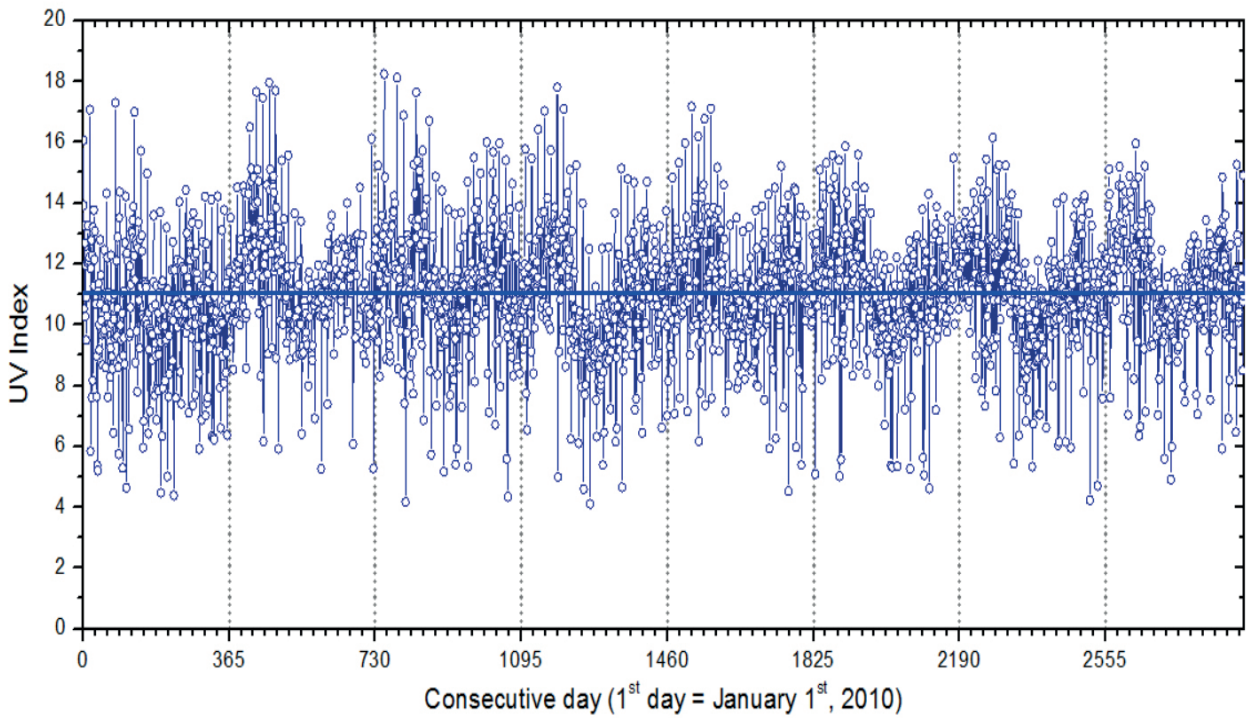
Now, a healthy solar exposure time to UV radiation can be obtained by the MED value for a given phototype, according to the Fitzpatrick classification. Considering that for a phototype



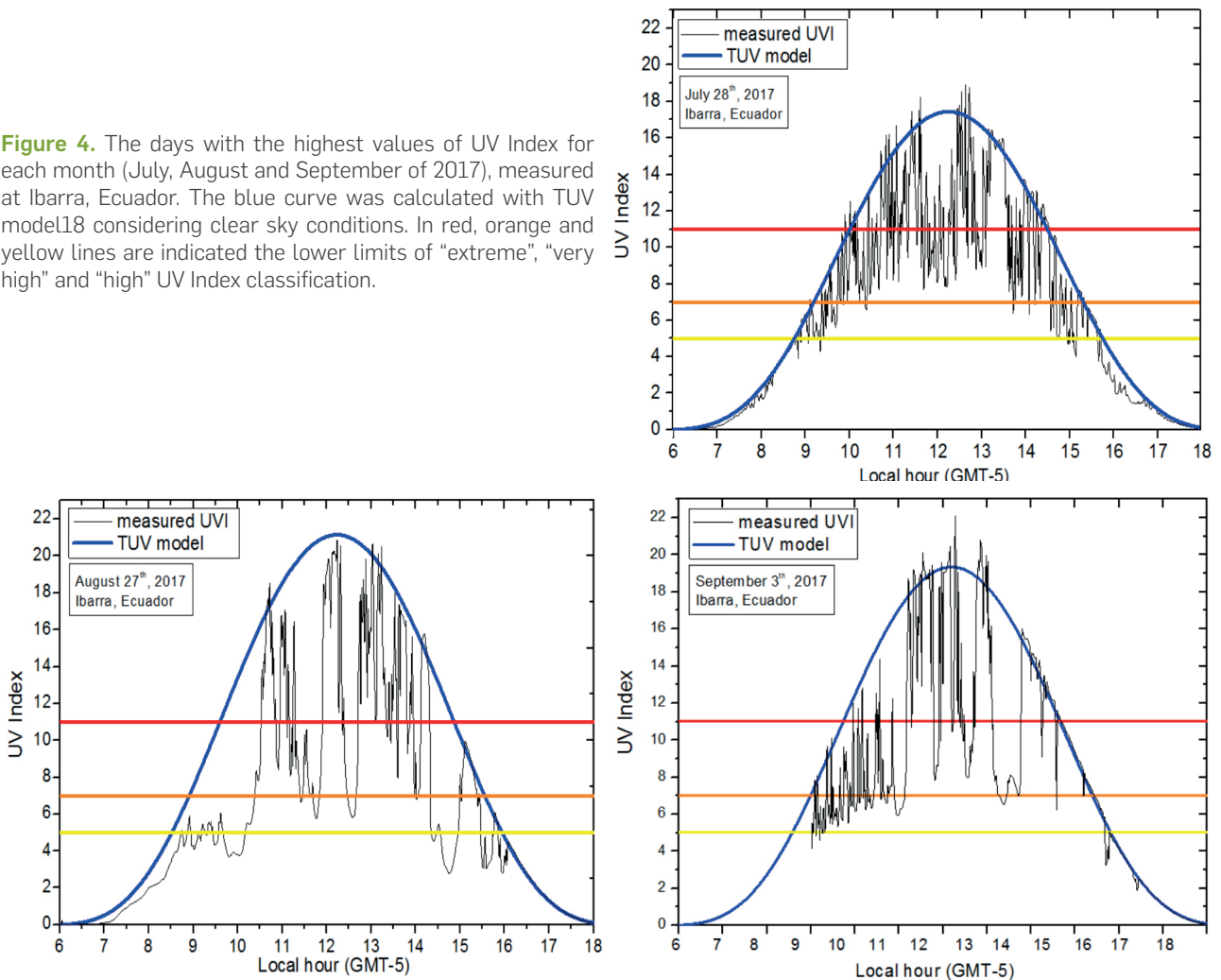
**Figure 2.** Measured UVI values (black line) as function of time for July (top), August (center) and September (bottom) 2017, at Ibarra, Ecuador. Averaged UVI values (blue line) determined with the TUV model18 considering monthly mean conditions clear sky days for each month, are also included. In red and orange lines are indicated the lower limits of "extreme" and "very high" UV Index classification.



**Figure 3.** UV Index from January 1st, 2010 to December 31st, 2016, measured by the OMI/KNMI instrument on board of Aura/ NASA satellite<sup>17</sup>. The blue horizontal line corresponds to the mean value in the analyzed period  $11.0 \pm 2.0$ .



**Figure 4.** The days with the highest values of UV Index for each month (July, August and September of 2017), measured at Ibarra, Ecuador. The blue curve was calculated with TUV model<sup>18</sup> considering clear sky conditions. In red, orange and yellow lines are indicated the lower limits of “extreme”, “very high” and “high” UV Index classification.



III the mean MED is equal to 400 J (see Table 2), in both cases (modelling and measuring), a person of skin type III should be exposed to the Sun for less than 16 minutes around noon.

#### v- Ozone analysis

Among the parameters that have a particular effect on the UVI (or the UV erythemal solar irradiance) on a clear sky day, in addition to the geographic location, the atmospheric ozone content is of large significance<sup>20</sup>.

In order to identify the atmospheric situation of Ibarra, we obtained the ozone total column from the OMI/Aura NASA satellite data base. The downloaded data are: (259±10) [DU]; (261±8) [DU] and (265±12) [DU] for July 28, August 27 and September 3, respectively. The values for the total ozone column are rather low with respect to the mean global value of around 300 UD, with an average value of (248.8 ± 12.2) DU, representing the mean of 12 years of data (from 2005 to 2016).

#### Discussion

This thorough analysis demonstrated the need for skin protection for people who predominantly perform activities outdoors in Ibarra, at high altitude, near the equator in Ecuador, even under cloudy skies. This conclusion is based on the fact that a maximum UV Index value, higher than 22 (0.55 W/m<sup>2</sup>), was recorded on September 3 at 12:16 local time (= Universal time - 5 hours). This is significant, since sunburned skin is the inflammatory acute effect of UV radiation. If the UV dose is higher than the threshold damage response, keratinocytes triggers apoptosis and die. In particular, UVB (directly related to the UV Index) stimulates the formation of DNA photo-lesions<sup>14</sup>.

From the 82 day measured, 72 days (corresponding to 87.8%) had UVI values higher than 11. These are considered by WMO and WHO standards to be "extreme UVI, and 14 days have UVI values over 20 (extremely high), which corresponds to 17.1 %. These extreme values confirm the influence of clouds reinforcing ultraviolet radiation in particular situations, especially the clear sky situation for September 3 when the UV Index is higher than 11 (lower limits of "extreme UVI") from 9:44 am to 2:39 pm, i.e. almost 5 hours of the day.

On the other hand, clouds can have a positive impact on the solar erythemal irradiance, in some instances significantly reducing the solar radiation, e.g. on September 9 at 12:18 there was a sharp fall of the UV Index from 17.1 (clear sky conditions) to a value of 5 ( a decrease of 71.2% of the UVI).

Special care must be taken by those of skin phototype mostly equal or lower than III when exposed to the Sun at high altitude sites near the Equator, such as Ibarra in Ecuador and nearby regions.

#### Acknowledgments

This work has been developed with the measurement equipment and facilities of the Universidad Técnica del Norte and the PIP CONICET N° 0405 project. The authors acknowledge the scientific team responsible for the operation and maintenance of the Surface Meteorology and Solar Energy (SSE)/NASA and the OMI/Aura NASA databases. They also acknowledge the support of the students Lizbeth Quiroz Cabascango, Tamia Yáñez Tamba and Jose Pinango Nuñez. A special thanks to Elisabeth Griewank for her continued support.

#### Bibliographic references

1. Piacentini RD, Cede A, Bárcena H. Extreme solar total and UV irradiances due to cloud effect measured near the summer solstice at the high-altitude desertic plateau Puna of Atacama (Argentina). *Journal of Atmospheric and Solar-Terrestrial Physics* 2003; 65:727-731. DOI: 10.1016/S1364-6826(03)00084-1.
2. Emck P, Richter M. An Upper Threshold of Enhanced Global Shortwave Irradiance in the Troposphere derived from Field Measurements in Tropical Mountains. *Journal of Applied Meteorology and Climatology*. 2008; 47: 2828-2845. DOI: 10.1175/2008JAMC1861.1.
3. Piacentini RD, Salum GM, Fraidenraich N, Tiba C. Extreme total solar irradiance due to cloud enhancement at sea level of the NE Atlantic coast of Brazil. *Renewable Energy* 2011; 36:409-412. DOI: 10.1016/j.renene.2010.06.009.
4. Salum GM, Tiba C, Fraidenraich N, Piacentini RD: Valores extremos de radiación solar total producidos por efecto de nubes, en Recife, Brasil. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente (AVERMA)* 2010; 14:11.07-11.10.
5. Cañarte C, Salum GM, Ipiña A y Piacentini RD. Índice ultravioleta como indicador de riesgo en la piel. 2010. Chapter 87 in *Dermatología Ibero-Americana-Online*. URL: <http://antoniorondonlugo.com/blog/wp-content/uploads/2010/05/87-Indice-ultravioleta-como-indicador-de-riesgo-en-la-piel.pdf>
6. Almeida MP, Zilles R, Lorenzo E. Extreme overirradiance events in São Paulo, Brazil. *Solar Energy* 2014; 110:168-173. DOI: 10.1016/j.solener.2014.09.012.
7. Juzeniene A, Brekke P, Dahlback A, Andersson-Engels S, Reichrath J, Moan K, Holick MF, Grant WB, Moan J. Solar radiation and human health. *Rep. Prog. Phys* 2011; 74:066701(56pp). DOI:10.1088/0034-4885/74/6/066701.
8. Andrade RC, Tiba C. Extreme global solar irradiance due to cloud enhancement in northeastern Brazil. *Renewable Energy* 2016; 86:1433-1441. DOI: 10.1016/j.renene.2015.09.012.
9. WHO, WMO, UNEP and NIRP: Global Solar UV Index: A practical guide. WHO/SDE/OEH/2.2. 2002. URL: <http://www.who.int/uv/publications/en/GlobalUVI.pdf>.
10. Zaratti F, Piacentini RD, Guillén HA, Cabrera SH, Liley JB, McKenzie RL. Proposal for a modification of the UVI Risk Scale. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2014; 13:980-985. DOI: 10.1039/c4pp00006d.
11. Lucas R, McMichael T, Smith W, Armstrong B. Solar Ultraviolet Radiation: Global burden of disease from solar ultraviolet radiation. *Environmental Burden of Disease Series*. 2006; 13. URL: <http://www.who.int/uv/publications/solaradgbd/en/>.
12. Weatherhead SC, Farr PM, and Reynolds NJ. Spectral effects of UV on psoriasis. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2013; 12(1):47-53. DOI: 10.1039/c2pp25116g.
13. de Grujil FR, van der Leun JC. Estimate of the wavelength dependency of ultraviolet carcinogenesis in humans and its relevance to the risk assessment of a stratospheric ozone depletion. *Health Physics* 1994; 67(4): 320-325.
14. S'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV Radiation and the skin. In. *J. Mol. Sci.* 2013, 14:12222-12248. DOI: 10.3390/ijms140612222..
15. Rivas MA, Rojas EE and Madronich S. Aumento del índice solar ultravioleta con la altura. *Revista chilena de ingeniería*. 2008; 16(2): 383-388.
16. Holick MF. Biological Effects of Sunlight, Ultraviolet Radiation, Visible Light, Infrared Radiation and Vitamin D for Health. *Anti-cancer Research* 2016; 36:1345-1356. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26977036>.
17. Hovila J, Arola A, Tamminen J. OMI/Aura Surface UVB Irradiance and Erythemal Dose Daily L3 Global Gridded 1.0 degree x 1.0 degree V3, NASA Goddard Space Flight Center, Goddard Earth Sciences Data and Information Services Center (GES DISC), Accessed [Data Access Date] 10.5067/Aura/OMI/DATA3009, 2013. URL: <https://giovanni.gsfc.nasa.gov/giovanni/>.

18. Madronich S. UV radiation and the natural and perturbed atmosphere, in UV-B Radiation and Ozone Depletion, edited by M. Tevini, Lewis, Boca Raton, Fla., 1993.
19. SSE/NASA - Atmospheric Science Data Center de la Nasa. URL: <https://eosweb.larc.nasa.gov/>.
20. Smith RC, Prézelin BB, Baker KS, Bidigare RR, Boucher NP, Cooley T, Karentz D, MacIntyre S, Matlick HA, Menzies D, Ondrusek M, Wan Z, Waters KJ. Ozone Depletion: Ultraviolet Radiation and Phytoplankton Biology in Antarctic Waters. Science 1992; 255(5047):952-959. DOI: 10.1126/science.1546292.

**Recibido:** 20 diciembre 2017

**Aprobado:** 29 enero 2018

## RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

### Obtaining and characterization of monoclonal antibodies against capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1, 5, 6B, 14 and 19F

#### Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales contra polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 1, 5, 6B, 14 y 19F

Fidel Ramírez Bencomo<sup>1</sup>, Abel Fajardo Sánchez<sup>2</sup>, Elizabeth González Aznar<sup>1</sup>, Oscar Otero Alfaro<sup>1</sup>, Darcy Núñez Martínez<sup>2</sup>, Reinaldo Acevedo Grogues<sup>3</sup>

DOI. 10.21931/RB/2018.03.01.4

502

**Abstract:** Five monoclonal antibodies named 2B5B10, 2E4D11, 1D12E10, 1D1D11 and 177/10/27/11 were produced against capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 1, 5, 6B, 14 and 19F respectively. They all were obtained by hybridoma technology and produced by in vivo procedures. Were purified by Protein A-based Affinity Chromatography and the yield of all processes was around the 2.9 and 3.7 mg per mL of ascitic fluid; and with a high purity (over 90% in all cases). All MAbs only reacted against their homologue polysaccharide showing no cross reactivity against other serogroups. The affinity constants (Kaff) measured by non-competitive ELISA were  $3.08 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$  for 2B5B10,  $1.53 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$  for 2E4D11,  $8.68 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  for 1D12E10,  $1.42 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$  for 1D1D11 and  $7.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  for 177/10/27/11. The potential application of these MAbs for identity tests was demonstrated by their abilities of no cross-react with the other purified PS presents in QuimiVio, through indirect ELISA

**Keywords:** monoclonal antibodies, *Streptococcus pneumoniae*, identity tests, ELISA

**Resumen:** Se produjeron cinco anticuerpos monoclonales denominados 2B5B10, 2E4D11, 1D12E10 y 1D1D11 contra los polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 5, 6B y 14 de *Streptococcus pneumoniae*, respectivamente. Todos fueron obtenidos por la tecnología del hibridoma y producidos por procedimientos in vivo. Se purificaron mediante cromatografía de afinidad basada en proteína A y el rendimiento de todos los procesos fue de alrededor de 2,9 y 3,7 mg por ml de líquido ascítico; y con una alta pureza (más del 90% en todos los casos). Todos los anticuerpos monoclonales solo reaccionaron contra su polisacárido homólogo que no muestra reactividad cruzada contra otros serogrupos. Las constantes de afinidad (Kaff) medidas por ELISA no competitivo fueron  $3,08 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$  para 2B5B10,  $1,53 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$  para 2E4D11,  $8,68 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  para 1D12E10 y  $1,42 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$  para 1D1D11. La posible aplicación de estos anticuerpos monoclonales para ensayos de identidad se demostró por su capacidad de no tener entrecruzamientos con los otros polisacáridos purificados presentes en QuimiVio, a través de ELISA indirecto.

**Palabras clave:** anticuerpos monoclonales, *Streptococcus pneumoniae*, ensayos de identidad, ELISA

### Introduction

*Streptococcus pneumoniae* bacterial infections are responsible for the majority of mortality and morbidity seen in the extremes of age, young children (< 2 years) and elderly<sup>1-3</sup>. The critical virulence factor of the bacteria is the capsular polysaccharide (PS), and based on it, there are recognized more than 90 serotypes<sup>4,5</sup>. The increasing number of antibiotic-resistant strains and the severity of pneumococcal diseases, make vaccination the most effective intervention<sup>6,7</sup>. Currently, there are four licensed vaccines available on the market to prevent this disease, all are based on the PS conjugated or not. (Table 1)<sup>8</sup> Similarly, there are other several pneumococcal vaccines in research and development state and others even in clinical trial<sup>8,9</sup>. QuimiVio, the Cuban PCV vaccine, is a 7-valent vaccine, developed at Finlay Institute, which it is under clinical trial. QuimiVio is composed by PS 1, 5, 6B, 14, 18C, 19F and 23F conjugated all to tetanus toxoid (TT) and adsorbed on aluminum phosphate (AlPO<sub>4</sub>). The vaccine coverage is according to the *S. pneumoniae* serotype circulating in Cuba<sup>10,11</sup>.

Production and manufacturing of these complex multi-

serotype polysaccharide conjugate vaccines are very difficult and challenging. Rigorous analytical characterization and the standard release and stability assays are required<sup>12</sup>. The World Health Organization (WHO) and Pharmacopoeia institutes provide guidance and recommendations on the type of release, stability, and characterization testing that should be performed at a minimum<sup>13</sup>. One of those critical tests are the identity and quantitation of each polysaccharide serotype including the carrier protein, in the multivalent formulation. So, to ensure the analytical techniques that allow carrying out the quality controls of this type of vaccine is without a doubt a very important aspect. Analytical techniques that been simple and rapid to perform and at the same time sufficiently specific<sup>14</sup>. In this respect, monoclonal antibodies (MAbs) have become a powerful analytical tool that have allowed, in polysaccharide vaccines like *Haemophilus influenzae b* Tetanus toxoid conjugate vaccines and in multivalent antipneumococcal polysaccharide vaccines, determine the content and the identity of PS<sup>15-17</sup>.

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

<sup>2</sup> Animal Models Department, Research Area, Finlay Vaccines Institute, Havana, Cuba

<sup>3</sup> Department of Biological Evaluation, Research Area, Finlay Vaccines Institute. Havana, Cuba

**Table 1.** Pneumococcal licensed vaccines

Generic Name	Brand Name	PS included
<b>Pneumococcal conjugate vaccine (PCV)</b>	Prevnar (7-valent) (Pfizer)	4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, and 23F conjugated to the nontoxic variant of diphtheria toxin (CRM197)
	Prevnar 13 (13-valent) (Pfizer)	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F and 23F conjugated to CRM197
	Synflorix (10-valent) (GlaxoSmithKline)	1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F and 23F all conjugated to protein D (derived from non-typeable <i>Haemophilus influenzae</i> ) except 18C and 19F that are conjugated to tetanus (TT) and diphtheria toxoid (DT) respectively
<b>Pneumococcal polysaccharide vaccine (PPV)</b>	Pneumovax (23-valent) (Merck)	1,2,3,4,5,6B,7F,8,9N,9V,10A,11A,12F,14,15B,17F, 18C,19A,19F,20,22F,23F and 33F

This paper describes the obtaining, production, purification and characterization of five MAbs against the capsular polysaccharides from *S. pneumoniae* serotypes 1, 5, 6B, 14 and 19F, which could have application in analytical assays for determine the identity of the PS in QuimiVio vaccine.

## Materials and methods

### Reagents and buffers

Buffers: Phosphate-buffered saline (PBS) (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4), blocking buffer (PBS, 3% non-fat dried milk), washing solution (PBS, 0.05% (v/v) Tween 20, pH 7.4), substrate buffer (orthophenylene-diamine (OPD), 35 mM citric acid, 67 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.012% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 5.0), stop solution (2.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Antigens: Plain purified capsular polysaccharide (PS) from *S. pneumoniae* serotypes 1, 5, 6A, 6B, 14, 18C, 19A, 19F, 23F and Polysaccharide C (Finlay Institute, Cuba); Tetanus toxoid (TT) (Finlay Institute, Cuba). Capsular polysaccharides from serotypes 1, 5, 6B, 14 and 19F conjugated to TT (PS1-TT, PS5-TT, PS6B-TT, PS14-TT and PS19F-TT) (Finlay Institute, Cuba)

Conjugated antibodies: sheep anti mouse IgG whole molecule conjugated to horseradish peroxidase. (Sigma-Aldrich, USA).

Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit. Bio-Rad, USA.

Chromatographic columns and supports: Column HiTrap rProtein A Fast Flow. Bed Volume: 5 mL. Column: XK 16/20; Support: Sephadex G 25 M. Bed volume: 30 mL.

**Table 2.** Immunization protocols

IP	MAB	Antigen	Doses	Via	Scheme
1	Anti-PS1	PS1-TT, lot 001.15.01 with Freund's complete adjuvant	10 µg	Subcutaneous	Three doses (0, 14, 28)
2	Anti-PS5	PS5-TT, lot 005.15.01 with Freund's complete adjuvant	10 µg		Three doses (0, 14, 28)
3	Anti-PS6B	PS6B-TT, lot 06B.15.01 with Freund's complete adjuvant	20 µg		Five doses (0, 14, 28, 42, 56)
4	Anti-PS14	PS14-TT, lot 014.15.01 with Freund's complete adjuvant	5 µg		Three doses (0, 14, 28)
5	Anti-PS19F	PS19F joined to pearls of polyhydroxyalkanoate (PhA)	20 µg		Three doses (0, 14, 28)

### Animals

All experiments were performed in BALB/c mice of 6-8 weeks of age and 18-20 g of body weight, obtained from the Center for the Production of Laboratory Animals (CENPALAB, Havana, Cuba). The animals were kept under controlled conditions of temperature (21-24°C), humidity (20-25%), alternating cycles of light/dark for 12 hours, and received food and water acidulated with HCl pH 2.5 ad libitum. The handling of these animals was performed according to established institutional norms, according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals<sup>18</sup>.

### Generation and selection of hybrids against PS-14 from *S. pneumoniae*

#### Immunization Protocol

Five groups of five female BALB/c mice were immunized subcutaneously with each polysaccharide emulsified v/v with Freund's complete adjuvant. Booster doses were given at 14-days interval with same concentration of immunogen but emulsified in Freund's incomplete adjuvant. Total number of doses administered was depending on the capacity of the immunogen to generate an antibody response in the animals. In order to determine it, blood samples were taken seven days after each immunization, from the third dose administered. Serum titers were checked by ELISA during the immunization schedule as described below. After obtaining the required antibody titers and 3 days before planned fusion process, a final intravenously booster of plain polysaccharide (same concen-

tration) without adjuvant was administered to mice which who had higher values of antibodies titers. Table 2 summarizes the different schemes followed in the different cases.

### Mouse serum titrations

Mouse serum titrations were performed by an indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). The plate (Maxisorp, Nunc, Denmark) was coated with 10 µg/mL of purified PsC in PBS and incubated at 4°C overnight. Then the plate was incubated with blocking buffer at 37°C for 1 hr. After, mouse sera (in two-fold serial dilutions starting from 1:1000 to 1:32000 in PBS) were added and incubated for 2h at 37°C. Subsequently, sheep anti mouse IgG dilution 1:1000 in washing solution with skimmed milk (1%) was added to the wells and incubated for 1h at room temperature. After every step the plate was washed three times with washing solution, except after the conjugate, that was washed four times. Substrate buffer was added to each well and the plates were incubated at room temperature in the dark. After 15 min, the reaction was stopped by adding stop solution to each well. The Optical Density (OD) of the reactions was measured at 492 nm (OD-492nm) in a Multiskan Microplate Reader (Thermo Scientific, USA). Mice with antibodies titers values over dilution 1:8000 were selected for fusion.

### Fusion and hybrid screening

Three days after the final booster, mice with higher titers were euthanized and the spleen removed to use as a source of cells for fusion with Sp2/0 myeloma cells (ratio 10:1) following the protocol described by Köhler and Milstein in 1975<sup>19</sup>.

After the fusion process, several selection steps were performed with the aim of determine the more specific hybrid. The screening was carried out by indirect ELISA, analogous to the one used in serum titration. In this case plates were coated with 10 µg/mL of each PS and TT individually and as sample 100 µL/well of undiluted culture supernatant was used. Hybrids were considered positive when OD492nm was twice the negative control (pre-immune mice serum). The hybrids that secretes the most specific Ab (highest OD against PS and lowest against the carrier TT), and also were of IgG isotype, (see isotype determination) were selected for cloning by limiting dilution technique. After cloning the hybrids were selected based on: growth form (single clone that covers the ¾ or more of the culture well) and MAb produced exhibit the highest response against their homologous PS and none against the carrier TT.

### Isotype determination

The isotype was determined by Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit, following manufacturer instructions, from supernatant of selected-as-positive growing hybridomas.

### MAb Production

For producing MAb, an *in vivo* method was chosen. Selected clones were injected intraperitoneally in a concentration of 1x10<sup>6</sup> cells/mL into Pristane-primed mice to obtain ascites. Five days after the administration, mice were investigated daily for production of ascitic fluid (AF). When the abdomens of the mice were enlarged, and their skins were extended, the AF were obtained by intraperitoneal puncture using 19 gauge needles and centrifuged at 12 000 rpm for five min. The related supernatants were collected and tittered by indirect ELISA similar to described above. In this case AF was employed as sample in two-fold serial dilutions starting from 1:1000 to 1:1024000 in PBS.

### Purification and characterization of MAbs

MAbs were purified from ascites by affinity chromatography using a HiTrap rProtein A Fast Flow column following manufacturer's instructions. Table shows the different recommended protocols for the most common subclasses.

Specific fraction (S.F.) was later desalted versus PBS in a Sephadex G-25 column. Total protein concentration in S.F. was quantified by the bicinchoninic acid reaction<sup>20</sup> using the Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma - Aldrich, USA) and Bovine Serum Albumin (BSA) as standard. Sample was replicated three times in appropriated dilutions for fixing to the standard curve. Productivity of the purification process was estimated and expressed as milligrams of MAb per milliliter of ascites. Purity was assessed by SDS-PAGE under reducing conditions on 12.5% polyacrylamide gel<sup>21</sup> followed by densitometric analysis using Quantity One software (Bio-Rad). MAb isotype was determined again to corroborate the results. The affinity constant (Kaff) was determined by indirect ELISA, following the method described by Beatty *et al.*<sup>22</sup>. Cross reactivity of MAb was evaluated by indirect ELISA similar to the one used in mice serum titrations but in this case 10 µg/mL of purified PS from *S. pneumoniae* serotypes 1, 5, 6A, 6B, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, Polysaccharide C and TT were used for coating step and purified MAb at 10 µg/mL in PBS was used as sample. The rest of the procedure was the same.

## Results

### Generation of hybrids producing MAbs against PS from *S. pneumoniae*

In the process of obtaining a hybrid producer of MAb, immunization is the initial step in obtaining the needed antigen-activated lymphocytes for the fusion process. Several *in vivo* immunization protocols are often successful and have been described previously<sup>23</sup>.

### Fusion and Hybrid selection

On fusion day, spleens from mice selected were extracted and the fusion procedure was performed following the protocol described by Köhler and Milstein in 1975<sup>19</sup>.

After fusion, three selection steps were carried out to select the hybrids that secrete the most specific Ab (highest OD against PS and lowest versus the carrier). At the end of the second selection step, six hybrids were selected against each PS and during the third step, they grew very similarly and all of them showed high response against their homologous PS and lower against TT in the indirect ELISA. They all were producers of IgG class MAbs. The selection was carried out based on the growth form (single clone that covers ¾ or more of the culture well) and the specificity of the response. The results are shown in Table 3.

Selected hybrids had a response against their homologous PS, significantly higher ( $p < 0.0001$ ) than the serum of the immunized animals, and a response against TT similar to the obtained for the negative control antibody. These hybrids also grew as a single clone, within hours occupied 100% of the well surface. Those were the conditions for the selection of the clones.

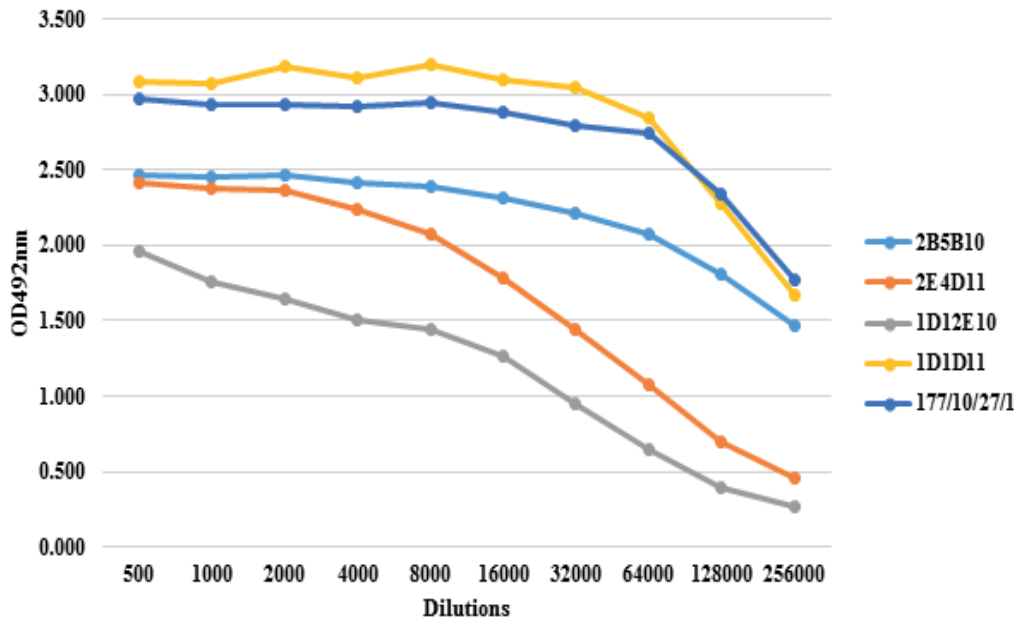
### Production of murine MAbs against Capsular Polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae*

For growing cells and producing MAbs, an *in vivo* procedure was selected. Twenty Pristane-primed mice, in five groups,

**Table 3.** Protein A purification protocols based in the different subclasses

Solutions	Monoclonal Antibodies		
	IgG1	IgG2a	IgG2b
<b>Union Buffer</b>	Glycine 1.5 M, NaCl 3 M pH 8.9	PBS pH 7.4	
<b>Elution Buffer</b>	Citric Acid 0.1 M pH 6	Citric Acid 0.1 M pH 5	Citric Acid 0.1 M pH 6 Citric Acid 0.1 M pH 3
<b>Neutralization Buffer</b>	Not needed	Tris 0.1 M pH 8	
<b>Column's Regeneration Buffer</b>	Citric Acid 0.1 M pH 3		

**Figure 1.** Anti PS IgG response in ascites of mice inoculated with hybrids 2B5B10 (1), 2E4D11 (5), 1D12E10 (6B), 1D1D11 (14) and 177/10/27/11 (19F). The titration was performed by indirect ELISA using serial two-fold dilutions beginning with dilution 1: 1000. The negative control (blank) used was non-immunized mouse serum. The results are expressed in optical density (OD)



were inoculated with  $1 \times 10^6$  cells/mL of hybridomas selected (Table 2) intraperitoneally to obtain ascites. Fifty (50) mL of ascites were collected ten days after inoculation from each group.

MAB's titer in ascitic fluid was measured by indirect ELISA method and absorbance (OD) of dilution (Figure 1). These results indicate, that all the hybrids do not produce the same quantity of MAbs, even when they were obtained with similar conditions during in the same fusion process, culture conditions and time of ascites developing.

Ascitic fluid production enriched with the MAb in mice is a quick and profitable method. The amount of injected Pristane and the period between priming with monoclonal cells are both significant factors in ascitic fluid production<sup>24, 25</sup>. Furthermore, the number of hybridoma cells injected in the peritoneum of mice is efficient concerning the increased speed of ascitic fluid production.  $1 \times 10^6$  cells injected in the peritoneum of mice could facilitate the harvest of about 2-3 mL ascitic

fluid from each mouse<sup>26</sup>. Some reports indicate that when a cell number of  $2.5 \times 10^7$  are inoculated, the average life span of mice is 8 days, while a number of  $3.2 \times 10^6$  extends this time to about 12 days. In these experiments, the ascites is formed faster with increased inoculum, however, a higher inoculum leads to a shorter survival<sup>27</sup>. Current standard protocols often inoculate a number of  $1 \times 10^6$  cells with an average life expectancy between 17-20 days, a period which enables the extraction of a greater volume of ascites<sup>23</sup>. This was the value selected in this study and achieved a survival rate of 14 days.

Since several liters of RPMI medium and fetal bovine serum (as well as several months of continuous struggle and attention) are required for the production of this amount of antibody by *in-vitro* method, it seems that the ascites production method is a very valuable and economic method.

On the other hand, during ascites development, animals should be observed at least three times per week for the first week and daily thereafter to monitor the degree of abdominal

**Table 4.** Fusion Percentage and clones selected in each fusion protocols subclasses

FP	MAB	Fusion Percentage	Clone selected	Subclass
1	Anti-PS1	100%	2B5B10	IgG2a
2	Anti-PS5	100%	2E4D11	IgG2b
3	Anti-PS6B	92%	1D12E10	IgG1
4	Anti-PS14	100%	1D1D11	IgG1
5	Anti-PS19F	61,8%	177/10/27/11	IgG2b



distention and signs of illness<sup>28</sup>. However, in our study, no significant evidence of distress was obtained in the animals.

### Purification of MAbs

One of the disadvantages of *in vivo* MAb production method, besides the suffering generated in the animals, is the fact that the material obtained (ascites) contains several own contaminants. Albumin, transferrin, proteases, nucleases and even other immunoglobulins (Igs) are typical contaminants of body fluids<sup>23</sup>.

All MAbs were purified by affinity chromatography in a Hi-Trap rProtein A FF column. Figure 2 shows the chromatographic profiles of purification processes of MAbs 2B5B10 (PS-1, IgG2a), 2E4D11 (PS-5, IgG2b) and 1D12E10 (PS-6B, IgG1). The remain MAbs profiles are not shown because they were very similar to the ones presented as they share subclasses.

As shown in Figure 2.A, the chromatographic profile, of the affinity chromatographic process from all MAbs are very similar, and it is characterized by two well defined peaks. Peak 1 corresponds to the first eluted fraction during the run, the unspecific fraction (UF), generally composed mainly by ascites pollutants which do not bound to the matrix and are eluted quickly. Peak 2 corresponds to the specific fraction (SF), which is retained on the column and eluted by pH changes after the addition of an elution buffer. Figure 2.B shows the profile obtained from size exclusion chromatography. This desalting step

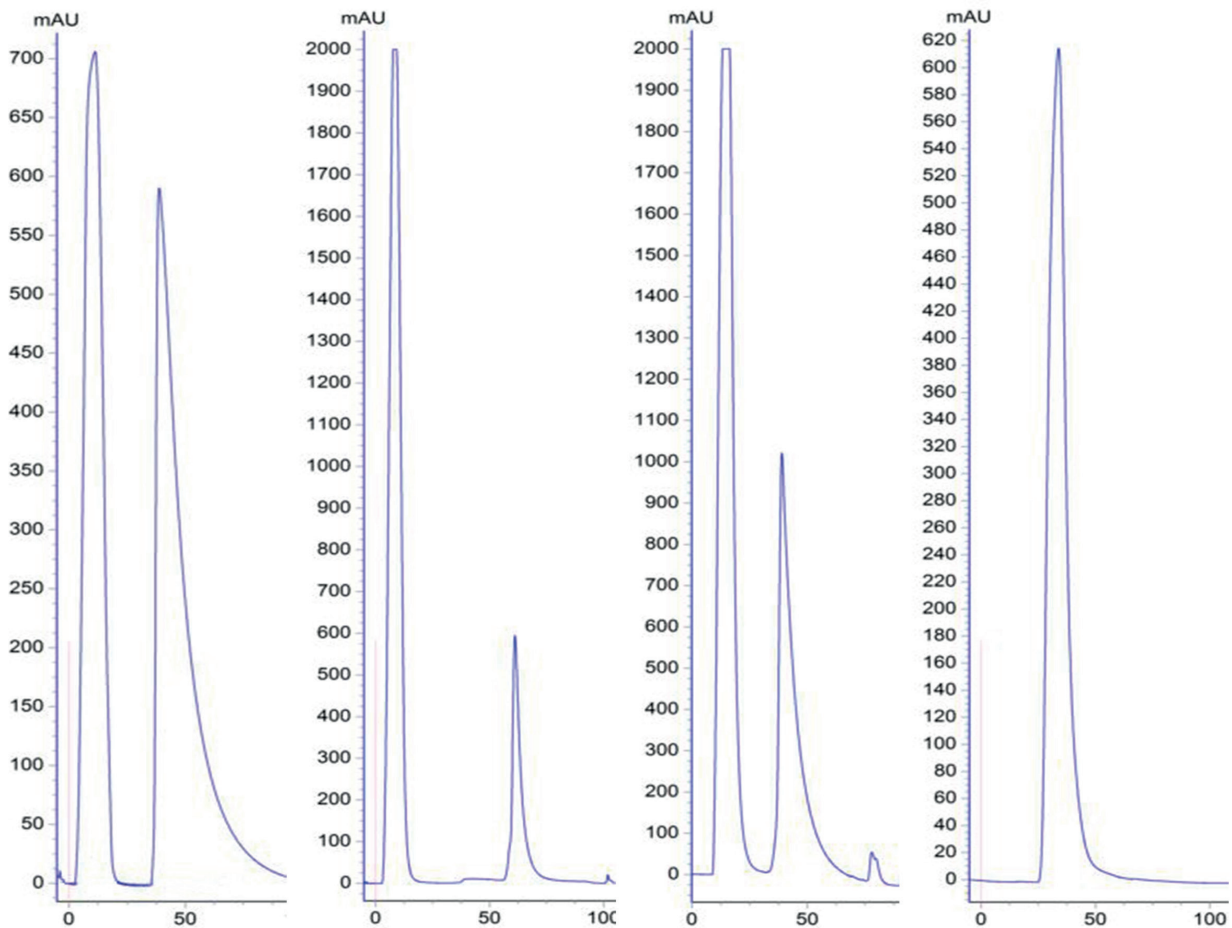
on purified MAbs is very important because it allows the removal of the excess of NaCl used in the purification, and allows purified MAb to remain in a more favorable conservation state, such as PBS buffer; increasing the stability of the MAbs<sup>29</sup>. In this case, peaks 2 of each purification process are not of the same height, it could be related with the fact that the ascites did not have the same antibody titer.

There are several methods for MAbs purification. Proceedings based on solubility differential like salting out (ammonium or sodium sulphate), caprylic acid or solvent addition, among others, are still used for isolation of fractions containing antibodies. These protocols are suitable for bulk proteins and when high purity is not necessary. Chromatographic methods based on anionic or cationic exchange, hydrophobic interaction, affinity and multi-step-strategies are usually used for reaching fine pure products<sup>30,31</sup>.

In the biopharmaceutical industry, chromatography is a critical and widely used separation and purification technology due to its high resolution. Chromatography exploits the physical and chemical differences between biomolecules for separation. The most of purification processes for MAbs involve Protein A-based chromatography, which results in a high degree of purity and recovery in a single step<sup>32</sup>.

Protein A is a bacterial protein from *Staphylococcus aureus* which naturally interacts with the Fc fragment of antibodies. The high affinity of Protein A for the Fc region of IgG-type

**Figura 2.** Chromatographic profiles of the purification process (From Left to Right). Affinity chromatography of MAbs 2B5B10 (PS-1, IgG2a), 2E4D11 (PS-5, IgG2b) and 1D12E10 (PS-6B, IgG1), using HiTrap rProtein A Fast Flow column respectively (Peak 1: Unspecific Fraction. Peak 2: Specific Fraction). Size exclusion chromatography of the specified fraction of MAb 2B5B10 (Desalting process).



antibodies constitutes the basis for the purification of IgG, IgG fragments and subclasses. The procedure typically employed for Protein A chromatography involves passage of clarified ascitic fluid or cell culture supernatant over the column at pH 6–8. Under these conditions the antibodies bind and unwanted components such as the ascites fluid contaminants or host cell proteins and cell culture media components flow through the column<sup>33</sup>.

Protein A chromatography follows harvest, and yields a relatively pure product that only requires removal of a small proportion of process and product related impurities. One or two additional chromatography steps are employed as polishing steps, generally incorporating cationic and anionic exchange chromatography, although hydrophobic interaction chromatography, mixed mode chromatography or hydroxyapatite chromatography may be chosen as well. These steps provide additional clearance, removing aggregates, unwanted product variant species and other ascitic fluid contaminants<sup>34</sup>.

Because of its high selectivity, high flow rate and cost effective binding capacity and its capacity for extensive removal of process-related impurities, Protein A chromatography is typically used as the first step in an antibody purification process. After this step, the antibody product is highly pure and more stable due to the elimination of proteases and other media components that may cause degradation<sup>34</sup>.

## MAbs characterization

### Productivity

**Table 5.** Productivity of purification process

MAbs	Concentration (mg/mL)	Yield (mg/mL of ascites)
2B5B10	1,12	3,5
2E4D11	1,44	3,0
1D12E10	1,30	2,9
1D1D11	1,03	3,7
177/10/27/11	2,10	3,5

The determination of total proteins in the desalted fraction allows calculate the productivity of the process. Protein concentration of purified MAbs and the yield are shown in Table 5.

Different productivities justify the fact that ascites titration curves were not the same, as OD is a directly proportional measure of the quantity of MAbs in the sample. Also, specific fractions were not the same in both profiles, corroborating the differences between clones regarding the quantity of MAbs produced. Also it could be due to samples did not have the same quantity of cells, implying differences in the quantity of MAb produced. This fact is not described in the literature, is something proper of each clone. These values of productivity are considered high and are consistent with the results obtained by our group for the process of obtaining other MAbs<sup>16, 17</sup>. It is described that ascites is a source of high concentration of MAbs (1-15 mg/mL)<sup>27</sup> while the culture supernatants of hybridomas are approximately a hundred or thousand times lower concentrated (0.01-0.05 mg/mL)<sup>35</sup>. In addition, the ascites fluid can be obtained easily and at a relatively low production cost, which is a good starting material for the production of non-therapeutic MAbs.

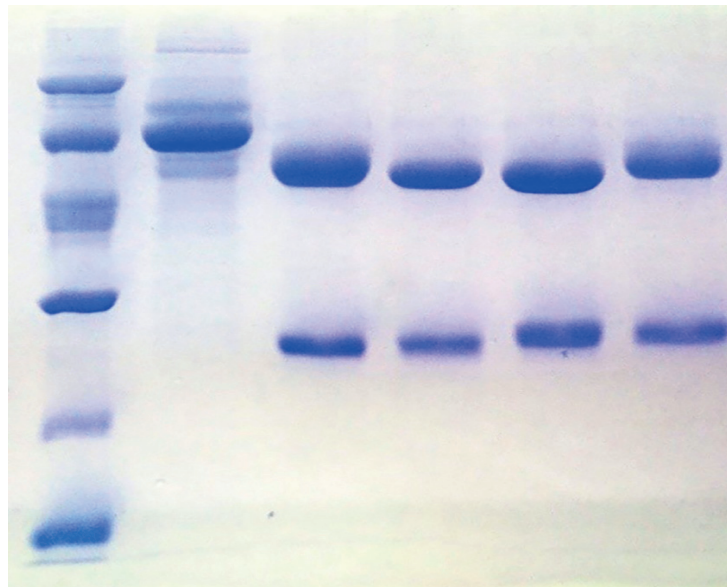
### Purity

Antibodies purification resulted in highly purified MAbs. Figure 3 shows the electrophoretic profile by SDS-PAGE under reducing condition, of each fraction involved in the purification process of both MAbs.

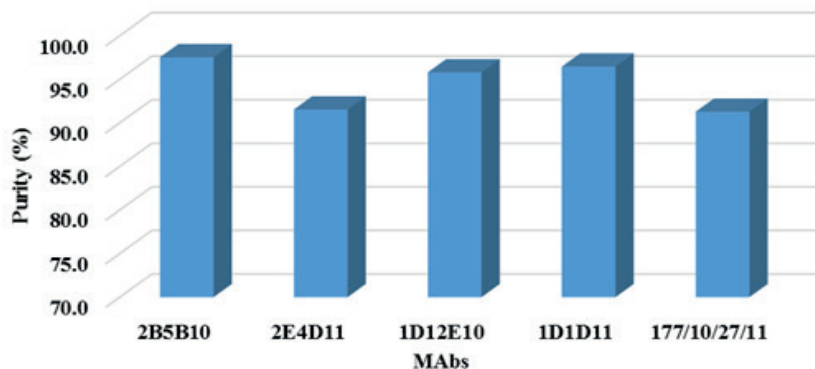
The electrophoretic profiles of the SF collected in the purification process from every MAbs are very similar. Lane 2 correspond to the U.F not retained in the column during the affinity chromatography. In all cases, the U.F is characterized by the exclusive presence of contaminants, showing an efficient adsorption of MAbs to the Protein A matrix. Remaining lanes show the purified MAbs. The bands visualized correspond to the heavy chains (50 kDa) and light chains (25 kDa) of murine IgG. Figure 4 shows the results of the densitometric analysis and the purity.

Antibody-purity analysis is critical to successful development of monoclonal antibody (MAb) biopharmaceuticals. Determine the degree or percentage of purity of a MAb, is im-

**Figure 3** Electrophoretic profile obtained by SDS-PAGE from the purification of MAbs. Lane 1: Low Molecular Weight Ladder. Lane 2: Unspecific fraction. Lane 3: 2B5B10. Lane 4: 2E4D11. Lane 5: 1D12E10. Lane 6: 1D1D11. Lane 7: 177/10/27/11.



**Figure 4.** Purity of MAbs determined by Densitometric Analysis



portant and gives us information about how efficient was the purification process used. As expected, by using protein A as ligand affinity chromatography, in the process of purification of both antibodies, high purity percentages were obtained (over 96%). On the other hand, determine the percentage of purity is important also for the MAb applicability. For diagnostic purposes, it is often sufficient antibodies preparations with 70 to 95% purity. For analytical purposes (as a standard reagent or for standardizing techniques to ensure quality control of a product), antibodies with a purity greater than 95% are required. And finally for therapeutic purposes, particularly humanized antibodies, are preparations that demands a percentage of pu-

**Table 6.** Affinity constant (Kaff) determined by indirect ELISA

MAbs	Kaff (M <sup>-1</sup> )
2B5B10	3.8 x 10 <sup>11</sup>
2E4D11	1.5 x 10 <sup>12</sup>
1D12E10	8.7 x 10 <sup>10</sup>
1D1D11	1.4 x 10 <sup>13</sup>
177/10/27/11	7.2 x 10 <sup>9</sup>

rity greater than 99% (36). Purity levels over 96% are enough for the goals of this MAb in our lab (as analytical tool).

#### MAbs affinity constant

Kaff determined by indirect ELISA are shown in Table 6.

These values were similar to those reported by Reyes and colleagues for MAbs against *N. meningitidis* serogroups A, C, Y, W and X<sup>16,17</sup>. It was thought that many of the MAbs had low affinity for biological molecules and therefore they will not displace polyclonal antibodies as instruments. Nowadays, it has been demonstrated that, with a proper selection procedure, it is possible to obtain high affinity MAbs; that have become a very reliable and essential tools for immunoassays<sup>15-17</sup>.

Affinity measures the strength of interaction between an epitope and binding site in the antibody. It is defined by the same basic thermodynamic principles that govern any reversible biomolecular interaction<sup>22</sup>.

Kaff describes how much antibody-antigen complex exist at the point when equilibrium is reached. The time taken for this happen depends on rate of diffusion and is similar for every antibody. However, high-affinity antibodies will bind a greater

amount of antigen in a shorter period of time than low-affinity antibodies. KA can therefore vary widely for antibodies from below 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> to above 10<sup>12</sup> M<sup>-1</sup>, and can be influenced by factors including pH, temperature and buffer composition.

Knowing the Kaff of an antibody allows judicious selection of antibody for a specific purpose, such as using low affinity antibody in an affinity chromatography procedure for antigen purification<sup>37</sup> or high-affinity antibody in immunoassay techniques<sup>38</sup>. Employment of low affinity antibody in an immunoaffinity column would allow purification and elution of the bound antigen with a mild elution buffer avoiding protein denaturation. The use of a high affinity MAb, on the other hand, is regarded as a decisive factor for improvement of the sensitivity of an immunoassay, such as ELISA. So, based on the affinity of our MAbs, both could be used in identity and quantification methods of PS-14 in QuimiVio by ELISA, as Reyes made with the MAbs for PS from *N. meningitidis*.

#### MAbs specificities

Recognition and reactivity of purified MAbs were evaluated by an indirect ELISA assay. Figure 5 shows the results.

The graph shows that OD<sub>492nm</sub> values were elevated against the homologous PS for each MAb, showing that maintain its reactivity after purification and do not cross react with polysaccharides from other serogroups or tetanus toxoid (carrier).

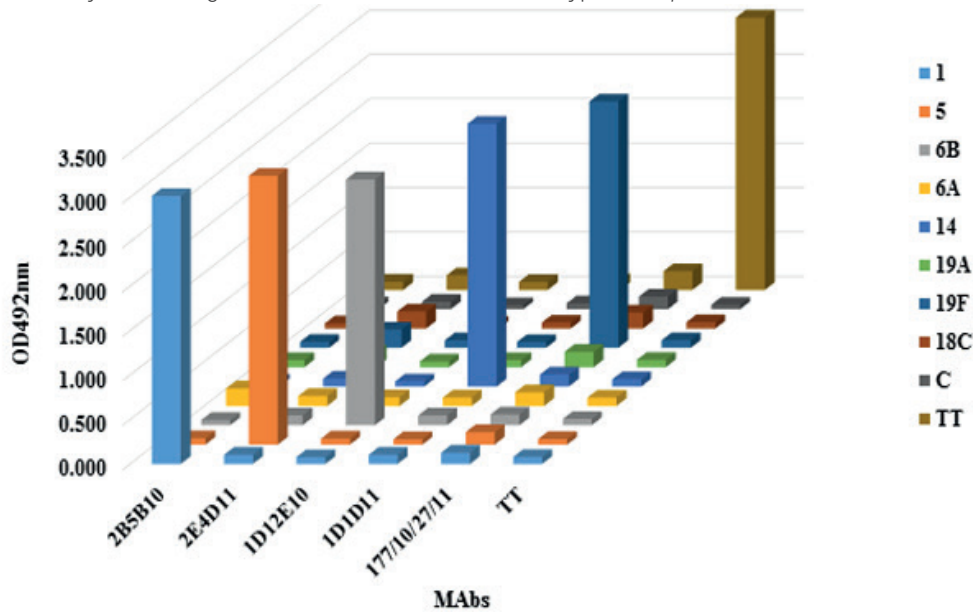
In manufacture of multivalent vaccines, WHO and National Regulatory Agencies (CECMED in Cuba), establish a mandatory requirement for all final vaccine: the identity of all the active principles declared in the sample (39-41). For protein vaccines, for example, by SDS-PAGE the bands profile can be identified and establish the identity of the product, however in the case of the polysaccharide based vaccines that is not so easy.

For this purpose, nuclear magnetic resonance spectroscopy (RMN) (either <sup>1</sup>H or <sup>13</sup>C) and/or serological method such as counter current immunoelectrophoresis provide convenient methods for the confirmation of identity of purified polysaccharide (14). However, NMR is a complicated and expensive technology and does not work for the conjugate polysaccharides due to the addition of a protein carrier; while preparation of monospecific antisera can be a costly and time-consuming activity.

#### Conclusions

Monoclonal antibodies (MAbs) have been obtained mainly as serogrouping reagents and have been used in identity test

**Figure 5.** Cross reactivity of MAbs against different PS from other serotypes of *S. pneumoniae*.



for other multivalent polysaccharide based vaccines<sup>16, 17</sup>. Having MAbs capable of identify in a multivalent formulation only their homologous PS and discriminate between compounds of related structure is a great tool for analytical assays. These results confirm the feasibility of using these MAbs in identity tests of multivalent vaccines.

## Bibliographic references

1. Simell B, Auranen K, Käyhty H, Goldblatt D, Dagan R, O'Brien KL. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert review of vaccines*. 2012;11(7):841-55.
2. Walker CLF, Rudan I, Liu L, Nair H, Theodoratou E, Bhutta ZA, et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *The Lancet*. 2013;381(9875):1405-16.
3. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *The Lancet*. 2009;374(9693):893-902.
4. Perciani CT, Barazzone GC, Goulart C, Carvalho E, Cabrera-Crespo J, Gonçalves VM, et al. Conjugation of polysaccharide 6B from *Streptococcus pneumoniae* with pneumococcal surface protein A: PspA conformation and its effect on the immune response. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2013;20(6):858-66.
5. Thomas JC, Figueira M, Fennie KP, Laufer AS, Kong Y, Pichichero ME, et al. *Streptococcus pneumoniae* clonal complex 199: genetic diversity and tissue-specific virulence. *PLoS One*. 2011;6(4):e18649.
6. Liñares J, Ardanuy C, Pallares R, Fenoll A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(5):402-10.
7. Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *The Lancet*. 2011;378(9807):1962-73.
8. Spijkerman J, van Gils EJM, Veenhoven RH, Hak E, Yzerman F, van der Ende A, et al. Carriage of *Streptococcus pneumoniae* 3 Years after Start of Vaccination Program, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*. 2011;17(4):584-91.
9. Lee GM, Kleinman K, Pelton SI, Hanage W, Huang SS, Lakoma M, et al. Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccination on *Streptococcus pneumoniae* carriage in young children in Massachusetts. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2013;pit057.
10. Toraño Peraza GT, Llanes Caballero R, Pías Solís LM, Abreu Capote M, Valcárcel Sánchez M. Serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en Cuba y progresión de la resistencia a la penicilina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2010;62:157-60.
11. Gilda Teresa TP, Lisania P, Miriam A, Mislady R, Félix D, Marlen V, editors. Serotipos y resistencia antimicrobiana de aislamientos meníngeos de *Streptococcus pneumoniae*, Cuba, 2007-2012. 8th Cuban Congress on Microbiology and Parasitology, 5th National Congress on Tropical Medicine and 5th International Symposium on HIV/aids infection in Cuba; 2014.
12. Frasch CE. Preparation of bacterial polysaccharide-protein conjugates: Analytical and manufacturing challenges. *Vaccine*. 2009;27(46):6468-70.
13. Organization WH. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of pneumococcal conjugate vaccines. Proposed replacement of TRS. 2009;927.
14. Standardization WECOB. Recommendations to Assure the Quality, Safety, and Efficacy of Pneumococcal Conjugate Vaccines: Proposed Replacement of : TRS 927, Annex 2: World Health Organization; 2009.
15. Reyes F, Otero O, Cuello M, Amin N, García L, Cardoso D, et al. Development of four sandwich ELISAs for quantitation of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, W and Y in multivalent vaccines. *Journal of immunological methods*. 2014;407:58-62.
16. Reyes F, Amin N, Otero O, Aguilar A, Cuello M, Valdés Y, et al. Four monoclonal antibodies against capsular polysaccharides of *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, Y and W<sub>135</sub>: Its application in identity tests. *Biologicals*. 2013.
17. Reyes F, Otero O, Camacho F, Amin N, Ramírez F, Valdés Y, et al. A novel monoclonal antibody to *Neisseria meningitidis* serogroup X capsular polysaccharide and its potential use in quantitation of meningococcal vaccines. *Biologicals*. 2014;42(6):312-5.
18. Council NR. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. Washington, DC: The National Academies Press; 2011. 248 p.
19. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *nature*. 1975;256:495-7.
20. Smith PK, Krohn RI, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenzano M, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. 1985;150(1):76-85.
21. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*. 1970;227:680-5.

22. Beatty JD, Beatty BG, Vlahos WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *Journal of Immunological Methods*. 1987;100(1-2):173-9.
23. Ward P, Adams J, Gebhart G. Monoclonal antibody production: a report of the committee on methods of producing monoclonal antibodies. Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council. 1999:9-23.
24. McArdle J. Alternatives to ascites production of monoclonal antibodies. *Animal Welfare Information Center newsletter (USA)*. 1997.
25. Brijesh K, Gadhvi V, Gupta A, Roopchandani K, Patel N. A Review: Production of Monoclonal Antibody. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2013;6(7):701-5.
26. Leenaars M, Hendriksen CF. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR Journal*. 2005;46(3):269-79.
27. Kabir S. Immunoglobulin purification by affinity chromatography using protein A mimetic ligands prepared by combinatorial chemical synthesis. *Immunological investigations*. 2002;31(3-4):263-78.
28. Peterson NC. Advances in monoclonal antibody technology: genetic engineering of mice, cells, and immunoglobulins. *ILAR journal*. 2005;46(3):314-9.
29. Healthcare GE. *Antibody Purification Handbook 2002-2015*. 48- p.
30. Scopes R. *Protein Purification Principles and Practice 3rd Edition* (Cantor CR ed) pp. 270-277 Springer-Verlag. New York. 1994.
31. Janson JC. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*: Wiley; 2012.
32. Fahrner RL, Knudsen HL, Basey CD, Galan W, Feuerhelm D, Vanderlaan M, et al. Industrial purification of pharmaceutical antibodies: development, operation, and validation of chromatography processes. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 2001;18(1):301-27.
33. Birch JR, Racher AJ. Antibody production. *Advanced drug delivery reviews*. 2006;58(5):671-85.
34. Liu HF, Ma J, Winter C, Bayer R, editors. *Recovery and purification process development for monoclonal antibody production*. MAbs; 2010: Taylor & Francis.
35. Juronen E, Parik J, Toomik P. FPLC purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid using blue DEAE and thiophilic sorbents. *Journal of immunological methods*. 1991;136(1):103-9.
36. Gottschalk U. Downstream processing of monoclonal antibodies: from high dilution to high purity. *Biopharm international*. 2005;18(6):42-58.
37. Van Heyningen V, Barron L, Brock D, Crichton D, Lawrie S. Monoclonal antibodies to human  $\alpha$ -foetoprotein: analysis of the behaviour of three different antibodies. *Journal of immunological methods*. 1982;50(2):123-31.
38. Steward MW, Lew AM. The importance of antibody affinity in the performance of immunoassays for antibody. *Journal of immunological methods*. 1985;78(2):173-90.
39. CECMED. *Requisitos para la liberación de lotes de vacunas*. Regulación No.19. 2000.
40. Organization WH. *Vaccine and immunization, quality and safety*. 2004..
41. OMS. *Manual de entrenamiento: concesión de licencias, liberación de lotes y disponibilidad de laboratorio*. Vacunas y productos biológicos. 2003.

**Recibido:** 31 october 2017

**Aprobado:** 29 december 2017

## RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

# Detection of pathogenic microorganisms in urine samples with BluBAC system

## Detección de microorganismos patógenos en muestras de orina con sistema BluBAC

Nardo Ramírez-Frómeta<sup>1</sup>, Carlos Abel Lamothe-Nuviola<sup>1</sup>, Elier Riverón-Rodríguez<sup>1</sup>, Carmen Yamilet Moreno-Barrios<sup>2</sup>, Angel Regueiro-Gómez<sup>3</sup>.

DOI. 10.21931/RB/2018.03.01.5

**Abstract:** The main purpose of this research was to evaluate the performance of BluBAC- an innovative system for the detection of pathogenic microorganisms in urine samples (uroculture). BluBAC system is based on the combination of photostimulation and turbidimetry. The urine samples were analyzed by the following three methods: direct count in Petri dish (reference method), DIRAMIC system and BluBAC system. Based on the conventional protocol for the obtention of samples for the analysis of uroculture, 350 samples from inpatients and outpatients. Results show a 100 % coincidence with the reference method and a detection time lower than 20 minutes in the 90 samples classified as positive. Although the obtained results must be amplified and corroborated with other studies, the sensitivity shown by BluBAC system in the detection of various enterobacteria is a new alternative to the diagnosis of urinary tract infections if consideration is given to the high costs of the systems for the rapid microbiological diagnosis available in the market and their negative impact on the economy of small and medium-sized laboratories, clinics and hospitals.

**Keywords:** Microbiological diagnostics, urinary tract infections, enterobacteria, blue light, photostimulation, BluBAC.

**Resumen:** El propósito principal de esta investigación fue realizar la evaluación del desempeño del nuevo sistema BluBAC en la detección de microorganismos patógenos en muestras de orina (urocultivo). El sistema BluBAC se basa en la combinación de las técnicas de fotoestimulación y turbidimetría. Las muestras de orina fueron analizadas mediante tres métodos: conteo directo en la placa de Petri (método de referencia), el sistema DIRAMIC y el sistema BluBAC. Teniendo en cuenta el protocolo convencional de obtención de las muestras para el análisis de urocultivo fueron analizadas un total de 350 muestras provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios. Los resultados alcanzados muestran un 100 % de coincidencia con el método de referencia y un tiempo de detección inferior a los 20 minutos de las 90 muestras clasificadas como positivas. Aunque los resultados obtenidos deben ser ampliados y corroborados con otros estudios la sensibilidad mostrada por el sistema BluBAC en la detección de diferentes enterobacterias constituye una nueva alternativa para el diagnóstico de infecciones del tracto urinario si se tienen en cuenta los altos costos de los sistemas para el diagnóstico rápido microbiológico disponibles en el mercado y su impacto negativo en la economía de los pequeños y medianos laboratorios, clínicas y hospitales.

**Palabras clave:** Diagnóstico microbiológico, infecciones del tracto urinario, enterobacterias, luz azul, fotoestimulación, BluBAC.

### Introduction

Infectious diseases are the world's second cause of death, and among these, those which are urinary tract-related have a significant impact (nearly an estimated 80 percent) on hospitalized patients<sup>1</sup>. During pregnancy, this pathology is one of the most frequent complications, accounting for 17 to 20 percent of pregnant women due to the fact that the pregnancy-associated physiological changes predispose the occurrence of complications that can significantly damage the mother and the fetus<sup>2</sup>. Despite the development of new antibiotics, urinary tract infection remains associated with an increased morbidity and mortality of both the mother and her unborn fetus accounting for around 27 percent of the premature deliveries worldwide<sup>3</sup>.

Throughout time a large number of methods have been developed to quickly detect the presence of bacteria in urine samples. An example of these is the development of various chemical, physical and immunological methods, and the latest ones based on flow cytometry among others<sup>4</sup>. Chemical methods are based on chemical reactions produced by the mi-

croorganism in front of the urine's own substrates or by those added, which change their color due to the bacteria's chemical action (example nitrate reduction, catalase production, etc.) Physical methods, many of which are already automated, mainly detect the presence of bacteria when their growth reaches a certain threshold (e.g. turbidity measurement, bioimpedance).

The development of quick and automated methods for microbiological diagnosis is growing worldwide; Sysmex system is an example. Based on the complex and expensive technique of flow cytometry, Sysmex system is useful to conduct large-scale screenings and discriminate the negative samples<sup>5</sup>. At present, the reference method for the analysis of urine culture is still the direct counting of microorganisms in a Petri dish. This is a manual, painstaking routine work which requires the samples to be cultivated for a period of 18 to 24 hours with controlled temperature and humidity.

As we looked at the detection times and the high costs of the systems for the rapid microbiological diagnosis available in

<sup>1</sup> Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) Ave. 25 y Calle 158, Playa, Apartado Postal 6412, La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Centro de Inmunología Molecular (CIM) Calle 216 esq. 15. Atabey, Playa, La Habana. Cuba

<sup>3</sup> Centro de Bioingeniería (CEBIO), Universidad Tecnológica de la Habana

the market- especially those systems intended for the diagnosis of urinary-tract infections, we were encouraged to conduct the evaluation of the performance of the new system –BluBAC- for the detection of pathogenic microorganisms in urine samples (uroculture)<sup>6</sup>. BluBAC is an economic system with appropriate benefits, integrating photostimulation,  $\lambda=470$  nm (blue light) and acquisition of data with turbidimetric method.

During the research conducted at the Microbiology Laboratory at the Medical-Surgical Research Center (CIMEQ Hospital, Havana-Cuba), the conventional protocol for the obtention of samples for the analysis of uroculture was taken into account and three methods were used: direct count in Petri Dish (reference method), DIRAMIC system (installed at the working laboratory) and BluBAC system. Both systems were developed at CNIC (Cuba's National Center for Scientific Research).

## Materials and methods

For the realization of the evaluative phase we used the DIRAMIC system (CNIC, Cuba), BluBAC system (CNIC, Cuba), and the Colony counter system on Petri Dish (RETOMED cc 2007, Cuba). Also used a Memmert INE 700 incubator and 5-1000  $\mu$ l adjustable Eppendorf Pippette.

### Other reagents:

Clinical strains of Enterobacteria (Laboratory of Microbiology at CIMEQ hospital Havana-Cuba).

Culture medium DETID-Ec, culture medium for the identification of *E. coli* (CNIC, Cuba).

Culture medium DKD, consists of modified Mueller-Hinton broth (OXOID), a PH  $7.4 \pm 0.2$  sterile solution which additionally includes a polymer. (CNIC, Cuba).

### Research Protocol for the detection of urinary infections

In the study of urine samples, three measurement alternatives were used. The first one uses the reference conventional method (viable count in Petri dish), using Petri dish available for their clinical use with 30 ml volume which includes tryptic soy Agar medium and neutralizers produced by German company MERCK. In order to perform the UFC/ml count in the samples, 5  $\mu$ l urine was cultivated based on the reference method in the indicated dishes. These were incubated for 24 h to 37°C and were afterwards examined. The result of the culture was reported positive if the count exceeds  $10^5$  CFU/ml of one or two potentially pathogenic microorganisms.

For the second alternative for the diagnosis of urinary infections, the DIRAMIC<sup>7</sup> system was used. In it 250  $\mu$ l of each urine sample was inoculated in 2.25 ml of DETID-Ec culture medium and an initial reading was made, which was considered as reference reading. The inoculated flasks were incubated for four hours at 37°C in the working incubator. After this time, a final reading is made. In those samples where the classification criterion was doubtful the incubation period was extended for one hour and the final reading was repeated. The obtained difference of readings is used for the diagnosis of the sample.

The third alternative uses a new developed system: BluBAC, in which 500  $\mu$ l of each urine sample is inoculated in 4.5 ml of DKD culture medium. The programmable readings are made every 5 minutes in order to analyze the kinetics of the culture growth. In this case, the samples were kept in the incubator and were also optically stimulated with a  $\lambda=470$  nm.

Results were classified according to the reference method (direct count in Petri dish):

- (i) Positives samples:  $\geq 10^5$  CFU/ml.
- (ii) Doubtful samples:  $< 10^5$  CFU/ml.
- (iii) Contaminated samples (Polymicrobial): more of 3 different colonies of microorganisms.
- (iv) Negative samples: without growth

### Samples

During this research developed in the laboratory of microbiology of CIMEQ hospital (Havana-Cuba), a number of 350 samples were analyzed; out of which eleven were classified as contaminated (more than 3 colonies of different microorganisms) therefore they were excluded from the statistical analysis. Thus a total of 339 samples of voluntary people were considered valid for our research.

### Data Validation

The data validation was conducted as the results of the measurements stored in the databases of the DIRAMIC and BluBAC systems were reexamined. In addition, such results were compared with the results in the book of control of uroculture at the microbiology laboratory. Results in the book of control of uroculture were classified as positive, contaminated or negative samples, respectively.

### Evaluation of the performance of the BluBAC system

The performance evaluation of BluBAC system was made with four indicators: E, percentage of coincidence versus direct count in Petri dish; sensitivity (S, related with the capacity of equipment to detect the sick people), and positive and negative predictive values (VPP, VPN: related with the probability of result to indicate the existence or absence of clinical pathology, respectively).

## Results and discussion

Conventional standard method (direct count in Petri dish) and DIRAMIC system were used to evaluate the research results with BluBAC system.

In its working procedure, the DIRAMIC system uses two culture media: DKD and DETIC-Ec. Culture medium DKD is used for both analyzing the urine culture and determining the antibiogram (a scheme of susceptibility to antibiotics). Culture medium DKD consists of modified Mueller-Hinton broth (OXOID), a PH  $7.4 \pm 0.2$  sterile solution which additionally includes a polymer. The inclusion of such polymer to the culture medium allows for the elimination of the inhibiting effect of catabolic products accompanying the inoculum of the samples to be tested.

On the other hand, culture medium DETIC-Ec can be used when *E. coli* wants to be identified in the tested sample in addition to analyzing the urine culture. This medium, in addition to the conventional nutritious bases that the culture medium Mueller Hinton (OXOID) contains has the subtracts MU- $\beta$ -D-glucuronide (0,1), L-Tryptophan (1 g), as well as the polymer used as depressor agent (1 g). These components are solubilized in 50 mM Potassium Phosphate to the pH of such medium between 7-7,5. These already used subtracts are useful to detect the activities of the  $\beta$ -D-glucuronidase and Tryptophanase enzymes produced by *E. coli*, through the formation of Indole. That is why after the bacterial growth, an auxiliary reagent is added to such medium (modified Kovac's reagent) for the revealing process. The product of the interaction of enzymes with its subtracts is detected in a first step, by exposing the samples where an increase in the turbidity (positives) is

detected to an UV light source.

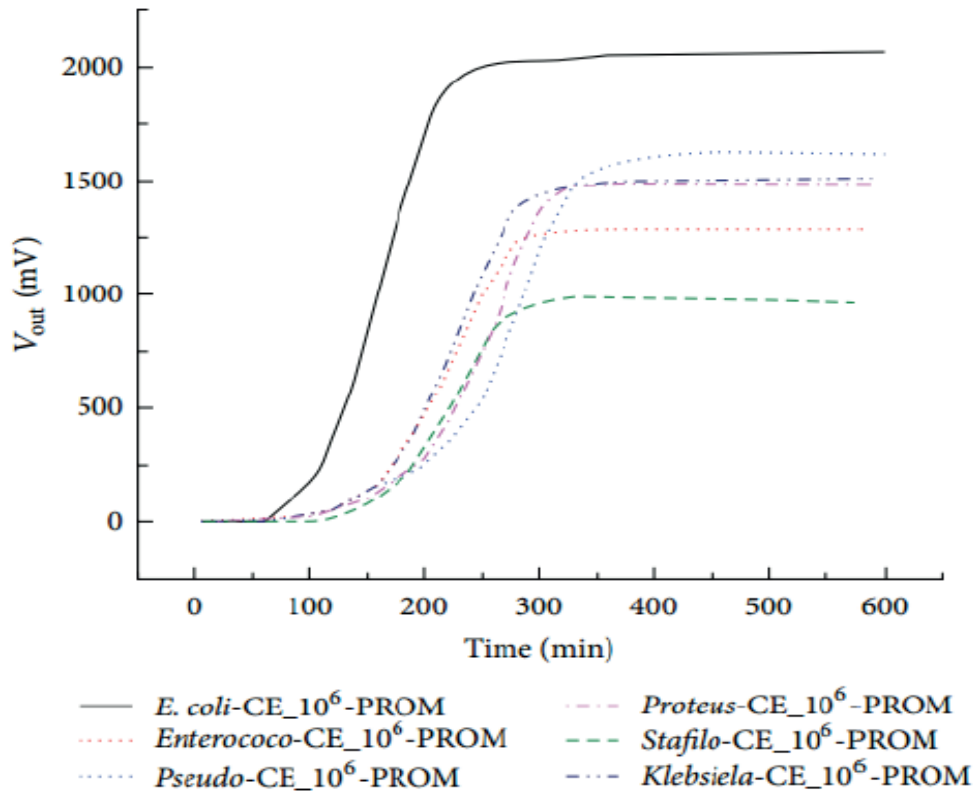
For the DIRAMIC system, no matter the medium used, each analysis (urine culture and/or antibiogram) lasts 4 hours. In order to make preliminary evaluation of the BluBAC system, medium DKD was used as it is more economical. However, medium DETIC-Ec was used in the work with DIRAMIC system as the objective of the hospital was to identify the presence of *E. coli* in the tested samples.

With the purpose of minimizing the impact of the false positives, every patient who took part in the test was given a sterilized flask in autoclave. In addition, they were instructed to follow the protocol to take the urine sample, which included the hygiene of the genitals, and that such sample should be the first urine sample taken in the morning. Such sample should be refrigerated and should be handed in the lab no later than two hours from the time it was taken. Also, in order

**Table 1.** Performance evaluation of BluBAC system

BluBAC results			
	True	Falses	Predictive values (%)
<b>Positives</b>	90	0	100
<b>Negatives</b>	249	0	100
<b>Total</b>	339	0	
<b>Coincidence (%)</b>	100		
<b>Sensibility (%)</b>	100		
<b>Specificity (%)</b>	100		

**Figure 1.** Shows typical registers related with kinetics of growth in different microorganisms.



to avoid the false negatives, a necessary condition was established: participation in the test should only be allowed if the patients should not be taking antibiotics, or at least seven days should have passed after the conclusion of any therapy with antibiotics. However, in a later evaluation phase, a study of the residual microbial activity is being considered.

The percentage of positive samples found was 26,54%. One-hundred percent of results (339 samples) coincided with both methods. No false positive or negative results were registered (Table 1), which means that the coincidence percentage for the statistical analyzed sample is considered satisfactory. With these results, a 100 % sensitivity and specificity was achieved. The predictive value of the positive samples and the negative ones was 100%.

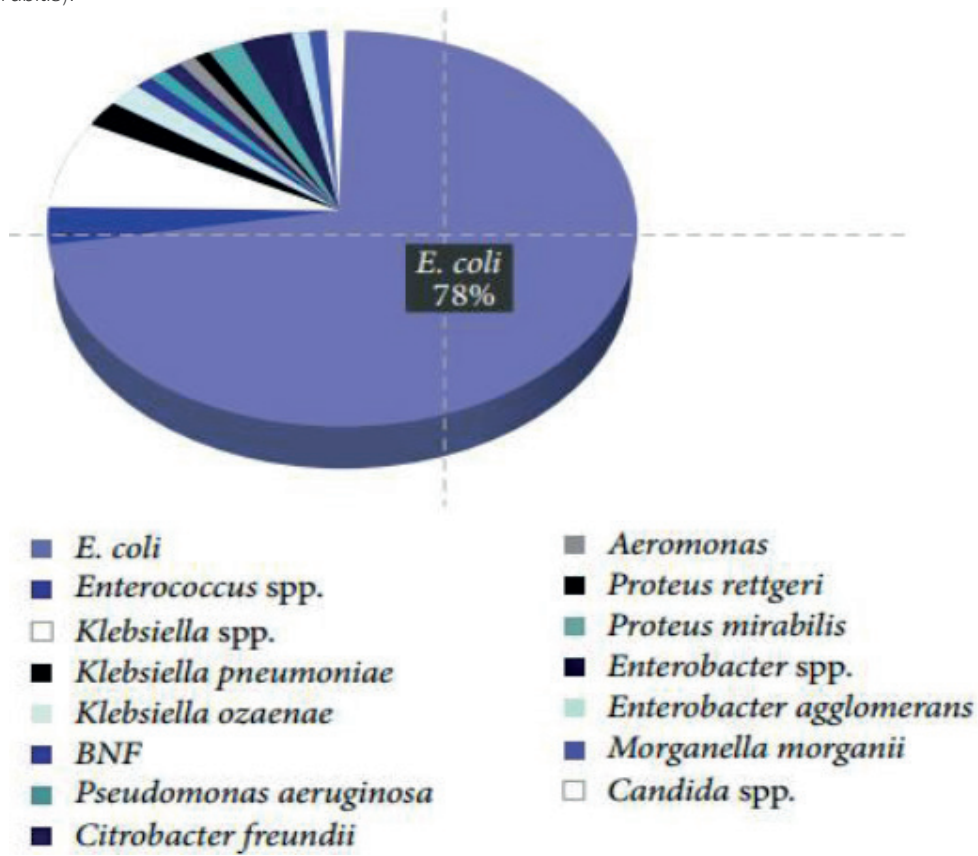
The higher percentage of infections is related to the presence of *E. coli* as the main pathogenic microorganism. These

values coincide with the studies conducted by Alvarez and col.<sup>8</sup> with the DIRAMIC system. They report that in Cuba the incidence of Urinary Tract Infection due to *Escherichia coli* reaches up to 82% (Fig. 2). Ninety-seven percent of infections were caused by gram-negative enterobacteria. This fact coincides with what Kang and his collaborators reported<sup>3</sup>.

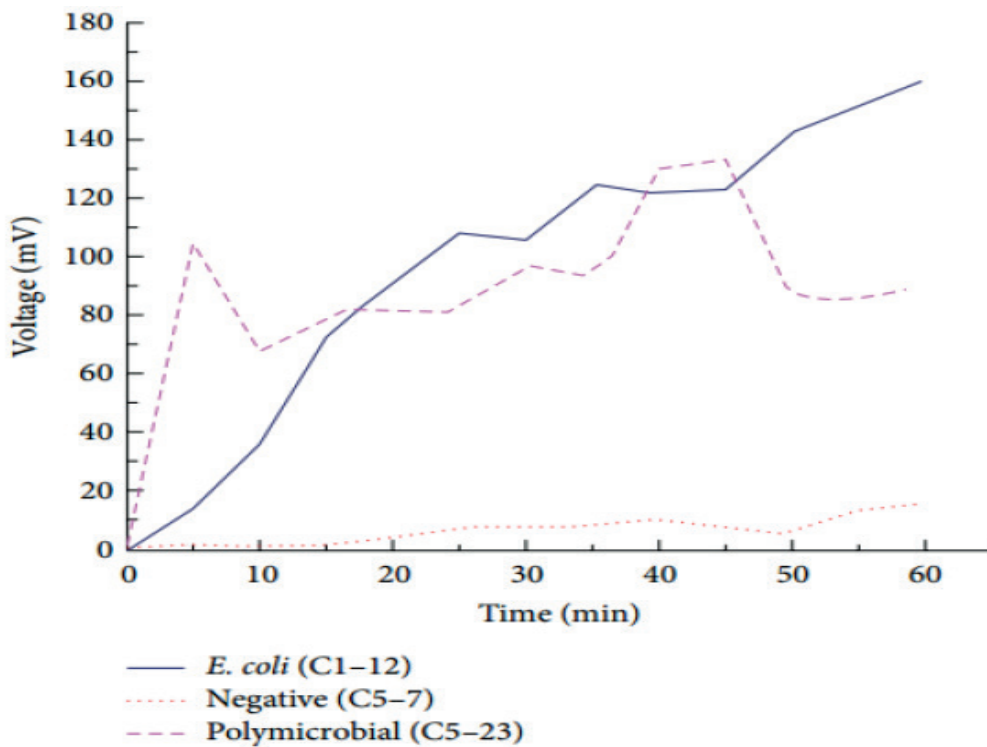
The employment of photostimulation with  $\lambda = 470$  nm significantly influenced the growth of enterobacteria studied and its detection time (< 20 minutes). Photostimulation effect on direct urine samples practically caused the absence of the lag phase and a longer exponential phase, which results in a higher level of microorganism's growth. The 2016 work table, by Nardo and collaborators<sup>6</sup> shows a brief characterization (costs, detection time and operation method) of the main commercial systems available for the rapid diagnosis of microbial infections, where it can be seen that the obtained results are way



**Figure 2.** Mains microorganisms founded during the conduct of the research (*Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Aeromonas*, *Proteus rettgeri* and *Proteus mirabilis*).



**Figure 3.** Examples of curves in urocultive samples when these samples were stimulated with blue light.



below the detection time by these systems at a lower cost. These results have been legally protected through the Cuban Office of Intellectual Property<sup>9</sup>.

The constant photostimulation of samples with blue light drives a growth expedited of the present microorganisms in the samples. We believe that the effect of photo-stimulation on doubling time of *E. coli* (often 20 to 30 minutes for most wild-type strains in a rich medium), can arise from the presence of factors in the urine or components of the infection site relating to the photoreceptors, quantitatively or qualitatively<sup>10,11</sup>. This result coincides with the point made by Tiphlova and Karu that photo-stimulation of growth depends on the conditions of cellular metabolism at the time of photostimulation<sup>12</sup>. However, investigations are required specially designed to elucidate the factors involved in such behavior.

## Conclusions

The results obtained in the evaluation of the performance of the new BluBAC system for the detection of pathogenic microorganisms in urine samples (uroculture) can be considered satisfactory. BluBAC system- based on the combination photostimulation and turbidimetry - showed 100 % coincidence with the reference method (direct count in Petri dish). The detection time of 90 samples classified as positive was four (4) hours by DIRAMIC system while by BluBAC system it was lower than twenty (20) minutes.

Although the results obtained must be amplified and corroborated with other studies, the sensitivity shown by BluBAC system in the rapid detection of various enterobacteria is a promising alternative to the diagnosis of urinary tract infections if consideration is given to the high costs of the systems for the rapid microbiological diagnosis available in the market and their negative impact in the economy of small and medium-sized laboratories, clinics and hospitals.

## Acknowledgment

This project was funded in part by the collaboration between Department of Bioengineering (Universidad Tecnológica de La Habana), Department of Microbiologic Diagnostics (CNIC: National Center for Scientific Research) and Laboratory of Microbiology - CIMEQ hospital.

## Bibliographic references

1. Cheol-In Kang, Doo Ryeon Chung, Jun Seong Son, Kwan Soo Ko, Kyong Ran Peck and Jae-Hoon Song. Clinical significance of nosocomial acquisition in urinary tract-related bacteremia caused by gram-negative bacilli. *American Journal of Infection Control* 2011, 39(2): 135-140. doi: 10.1016/j.ajic.2010.03.022.
2. Vazquez JC, Abalos E. Treatments for symptomatic urinary tract infections during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011 Jan 19;(1)1-6:CD002256. doi: 10.1002/14651858.CD002256.pub2.
3. Albert X, Huertas I, Pereiró II, Sanfélix J, Gosalbes V, Perrota C. Antibiotics for preventing recurrent urinary tract infection in non-pregnant women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;(3): 2-16. CD001209.
4. Dalet, F and del Rio-G (1997). *Infecciones urinarias*. Ed. Panamericana. Madrid.
5. de Frutos-Serna M, Asensio-Calle ML, Haro-Pérez AM, Blázquez-de Castro AM, Gutiérrez-Zufiaurre MN, Iglesias-García J. Evaluation of the Sysmex UF-1000i flow cytometer for screening of urinary tract infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014, Mar; 32(3):147-51. doi: 10.1016/j.eimc.2013.02.015. Epub 2013 Apr 30.
6. Ramírez-Frómata N, Lamothe-Nuviola CA, Riverón-Rodríguez E et. al. BluBAC system for determining microbial growth in clinical microbiological diagnosis samples by combining photostimulation and turbidimetry. *Bioteconología Aplicada* 2016; Vol. 33, No. 2. <http://elfossicientia.cigb.edu.cu/PDFs/Bioteconol%20Apl/2016/33/2/BA003302EN2401-2405.pdf>. Accessed on July 31, 2017.
7. Zayas-Tamayo AM, Barreras-García G, Álvarez-Varela E. Detección mediante el Sistema DIRAMIC de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y comparación con otros métodos utilizado en la práctica clínica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 2013, 44 (2). <http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/deteccion-de-C3%B3n-mediante-el-sistema-diramic-de-staphylococcus-aureus-resistente-meticilina-sarm>. Accessed on July 31, 2017.
8. Alvarez-Varela E, Contreras-Alarcón R y Alvarez-Pineda A. Resistencia microbiana en la red nacional cubana de laboratorios con equipos Diramic durante los años 2002 al 2004. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 36, No. Especial, 2005. <http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB-2005-4-CB-015.pdf>. Accessed on July 31, 2017.
9. Ramírez-Frómata N, Lamothe-Nuviola CA, Riverón-Rodríguez E, Moreno-Barrios CY, Regueiro-Gómez A, Contreras OR. Sistema para la detección de microorganismos fotosintéticos y no fotosintéticos en muestras biológicas por fotoestimulación controlada. Patent pending, CU 2016-0070; 2016.
10. Masuda, S. Light Detection and Signal Transduction in the BLUF Photoreceptors. *Plant Cell Physiol*. 2013 Feb;54(2):171-9. doi: 10.1093/pcp/pcs173. Epub 2012 Dec 14.
11. Jung A, Domratheva T, Tarutina M, Wu Q, Ko WH, Shoeman RL, Gomelsky M, Gardner KH, Schlichting I. Structure of a bacterial BLUF photoreceptor: Insights into blue light-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102 (35): 12350-12355. doi: 10.1073/pnas.0500722102.
12. Tiphlova, O and Karu;T (1991). Action of low-intensity laser radiation on *Escherichia coli*. *Crit Rev Biomed Eng*. 18(6): 387-412. <https://www.isan.troitsk.ru/dls/publ/126.pdf> Accessed on July 31, 2017.

Recibido: 11 october 2017

Aprobado: 29 december 2017

## RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

# Memorias de congresos versus artículos científicos: análisis del caso ecuatoriano.

## Conference proceedings versus articles: The Ecuadorian case analysis.

José Antonio Castillo

DOI. 10.21931/RB/2018.03.01.6

516

**Resumen:** Los recientes incentivos promovidos por el gobierno ecuatoriano buscan ampliar las capacidades de investigación y la productividad científica de este país que tradicionalmente ha mostrado bajo desempeño científico. Se analizan las actas de congresos (MCs) para estimar la participación de investigadores ecuatorianos en conferencias científicas internacionales. El número y el impacto de las MCs se compararon con artículos científicos para el período 2006-2015, usando datos bibliométricos. Los resultados indican que la productividad de ambos tipos de documentos ha aumentado, pero principalmente las actas. Las MCs mostraron menor impacto científico que los artículos, determinado por el número de citas y el indicador SJR. Los investigadores ecuatorianos prefieren participar en conferencias realizadas en países hispanohablantes, probablemente debido a similitudes de idioma y cultura. Estos análisis sugieren que los incentivos están promoviendo la internacionalización de los investigadores; sin embargo, desde la perspectiva del impacto científico, se debe impulsar preferentemente la publicación de artículos.

**Palabras clave:** memorias de congresos; productividad de la investigación científica; colaboración internacional; coautoría; Ecuador.

**Abstract:** The recent incentives promoted by Ecuadorian government seek to increase research capabilities and scientific productivity in this country that has traditionally been scientifically low. The impact of new regulations and programs on changing Ecuador's science landscape is analyzed. The analysis is focused on conference proceedings which were used as proxy to measure the participation of Ecuadorian researchers in international scientific conferences. Number and impact of conference proceedings were compared with journal articles for the 2006-2015 period, using bibliometric data. Results showed that productivity of both types of documents has increased, but mostly proceedings. Ecuadorian researchers prefer to participate in conferences held in Spanish-speaking countries probably due to language and culture similarities. Proceedings showed lower scientific impact compared to articles, as measured by citation counts and SJR indicator. These analyses suggest that incentives are promoting internationalization of researchers, however, from the perspective of scientific impact, publishing articles should be pursuing preferably.

**Keywords:** conference proceedings; scientific research productivity; international collaboration; co-authorship; Ecuador.

### Introducción

Las actas o memorias de congresos (abreviado en lo sucesivo como 'MCs') son un canal reconocido para la comunicación científica y juegan un papel importante en la difusión técnica de avances científicos. Estas publicaciones tienen un papel complementario a los artículos científicos, ya que son útiles para presentar nuevos avances, exponer resultados parciales de las investigaciones y aplicaciones de metodologías a casos particulares<sup>1</sup>. Las MCs son el resultado de la participación activa de los investigadores en conferencias, congresos y en general, en diversos tipos de reuniones científicas. La participación de los investigadores en estas reuniones se ve favorecida por la posibilidad de examinar las tendencias del campo de conocimiento en el que trabajan, establecer o renovar redes sociales entre colegas de la especialidad, presentar resultados parciales de investigación y discutir nuevos avances. Las MCs son útiles para una difusión más rápida de los resultados de la investigación y contienen la información más reciente en un campo particular en comparación con los artículos regulares<sup>2</sup>. La importancia de las MCs ha ido creciendo en los últimos tiempos particularmente impulsada por la posibilidad de almacenamiento de

enormes cantidades de trabajos presentados en congresos y reuniones científicas en repositorios digitales y grandes bases de datos que son accesibles masivamente. Las MCs son publicadas generalmente como resúmenes o artículos completos publicados en libros de actas (monografías), libros seriados o incluidos en números ordinarios de revistas científicas. A pesar de las ventajas de las MCs, éstas tienen algunos inconvenientes. Las MCs se vuelven obsoletas más rápidamente que los artículos regulares<sup>2</sup> y tienen un impacto científico menor que las publicaciones en revistas científicas, principalmente porque son menos citadas<sup>3</sup>.

En ciertos campos del conocimiento, las MCs son particularmente importantes. La ingeniería, la informática y la ciencia de la computación se destacan por su proclividad en la producción de MCs como resultado de presentaciones en conferencias altamente respetadas<sup>4, 5</sup>. Muchas de las MCs en estos campos son publicaciones que equivalen a artículos publicados en revistas científicas debido a su alto nivel e importancia<sup>6</sup>, sin embargo, esto no se aplica a todos los campos. En las ciencias naturales y otras áreas, las MCs se consideran trabajos para evaluar ideas, mostrar resultados

preliminares o difundir productos intelectuales incompletos o menos elaborados que los artículos, por lo tanto, tienen menos impacto<sup>7</sup>.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este artículo se utilizan datos bibliométricos sobre las MCs como una aproximación hacia la comprensión de la participación de investigadores ecuatorianos en congresos y diversos tipos de reuniones científicas. Además, este trabajo busca indagar sobre la productividad y el impacto científico de las MCs producidas por ecuatorianos en comparación con los artículos, la influencia de la colaboración internacional en la participación en las conferencias y los campos del conocimiento preferidos por los ecuatorianos. El análisis presentado aquí permitirá evaluar el impacto de las políticas públicas expresadas en reglamentos, programas y otras iniciativas que las instituciones nacionales han diseñado y puesto en práctica para incentivar la generación y aplicación de conocimiento en el Ecuador. Se espera que los resultados de este estudio ayuden a ajustar la política pública actual diseñada por el gobierno ecuatoriano y aporten algunas sugerencias a organizaciones nacionales de países vecinos de América Latina para evaluar y ajustar las políticas públicas existentes a fin de mejorar la ciencia y la tecnología regional.

Este trabajo se basa en datos bibliométricos de 10 años (2006-2015) que están disponibles en grandes bases de datos (en este caso, se utilizó la base Scopus). La bibliometría se ha convertido en una herramienta importante para la política pública y la gestión de la investigación científica en las últimas décadas. Aunque en muchos contextos académicos, la bibliometría es considerada incompleta sino está acompañada por otro tipo de análisis (análisis crítico de expertos, por ejemplo), aún es muy valiosa para diseñar y ajustar las políticas públicas, tomar decisiones sobre el desempeño de la investigación, la gestión del talento humano y la financiación de entes académicos, organizaciones y actividades científicas. Este tipo de estudio en otros países ha dado como resultado una mejora de la productividad científica, lo que se ha traducido, con el paso del tiempo, en un mayor número de artículos publicados en revistas de mayor impacto<sup>8</sup>.

Para dar contexto a este análisis, se debe indicar que el Ecuador ha tenido tradicionalmente una baja productividad científica, con universidades orientadas a la enseñanza principalmente y no a la investigación científica o al desarrollo tecnológico<sup>9</sup>. Varias dificultades estructurales a nivel de país y la falta de cultura investigativa inciden en la baja productividad científica del país<sup>10</sup>. Consciente de estas limitaciones, la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia y Tecnología (SENESCYT) ha intentado los últimos años impulsar la investigación y la innovación en el Ecuador. Esta institución pública ha diseñado y promovido varias estrategias para incentivar la creación y aplicación del nuevo conocimiento, para reconocer el trabajo científico realizado por los investigadores nacionales y el establecimiento de redes colaborativas entre científicos nacionales y extranjeros<sup>11</sup>.

A lo largo de los años ha habido varios intentos de analizar el desempeño científico ecuatoriano. Estos varían desde simples comentarios y remembranzas<sup>12, 13, 14</sup> hasta estudios basados en datos y evidencias<sup>15, 16, 17</sup>. Posiblemente los dos trabajos más comprensivos, basados en datos (bibliométricos, económicos y otros), que incluyen análisis del impacto de la política pública en la ciencia ecuatoriana son los artículos de Lemarchand<sup>18</sup> y de Castillo y Powell<sup>19</sup>. En su capítulo 'Latino América', Lemarchand realiza un análisis sobre la relación entre indicadores económicos, estabilidad política, intensidad

tecnológica, educación superior y otros con la productividad científica de los países latinoamericanos. Este estudio incluye un análisis detallado del caso del Ecuador, entre otros países de la región. Por su lado, Castillo y Powell<sup>19</sup>, estudiaron la productividad general de la investigación científica del Ecuador utilizando información bibliométrica. Ellos realizaron un análisis de la colaboración internacional y su contribución al volumen de publicaciones e impacto científico. Finalmente, discuten posibles razones que explican los resultados logrados por la ciencia ecuatoriana durante los últimos 10 años.

## Materiales y métodos

Los datos bibliométricos se recopilaron de la base de datos Scopus en diciembre de 2016 y junio 2017. Puesto que Scopus indexa MCs como documentos presentados en conferencias muy respetadas, la mayoría proceden de eventos internacionales (97% de los documentos analizados fueron presentados en conferencias internacionales). El trabajo se ha centrado en el período 2006-2015. Este período de 10 años es importante ya que el gobierno nacional ha impulsado diferentes políticas y regulaciones que han cambiado el curso de la investigación científica en el Ecuador. Se prestó especial atención a las MCs y los artículos publicados en revistas científicas producidos por investigadores ecuatorianos.

Con el fin de lograr los objetivos de este estudio, se utilizaron indicadores bibliométricos y estadística descriptiva. Para medir la colaboración internacional se prestó atención a la coautoría entre autores ecuatorianos e internacionales. Para ello, se tabularon todas las MCs y artículos publicados por al menos un autor afiliado a una institución ecuatoriana, y autores afiliados a instituciones no-ecuatorianas. Para estimar el campo de conocimiento de las MCs se utilizó el sistema de clasificación en 27 campos de Scopus, aunque se presentan solo los más representativos en los resultados (Figura 2).

Para estimar el impacto de las MCs y de los artículos científicos se utilizaron estadísticas de citas, lo que es, número total de citas que han recibido estas publicaciones. Se ha utilizado también un indicador SJR (SCImago Journal Rank)<sup>20</sup>. SJR es una puntuación métrica ponderada, independiente del tamaño, que proporciona información sobre el prestigio promedio de las revistas científicas, por tanto, es útil como indicador de la calidad relativa de las revistas<sup>20, 21</sup>.

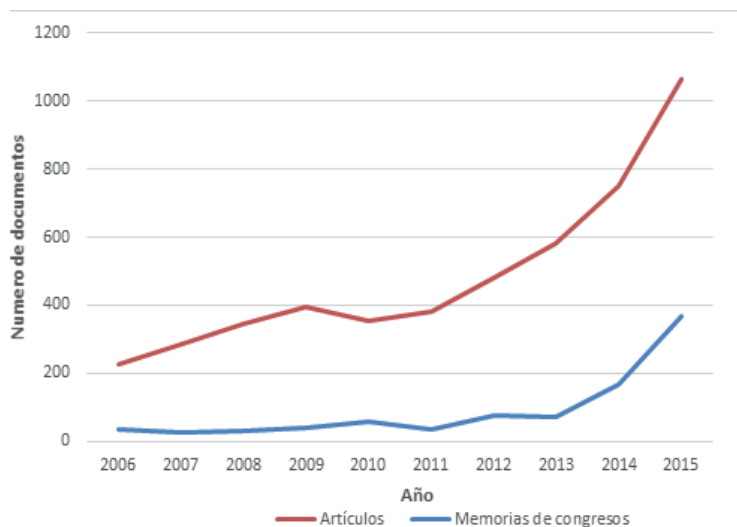
Por último, los resultados presentados en las conferencias y reuniones científicas suelen difundirse a través de libros de memorias o de una sección especial que se incluye en los números regulares de las revistas científicas. Una tercera alternativa de difusión son las colecciones o series de libros que publican resultados de conferencias de alto nivel. Para el caso ecuatoriano, se estimó el número e impacto científico de estos tres tipos de documentos utilizando el indicador SJR.

## Resultados y discusión

### Memorias de congresos y artículos científicos producidos por investigadores ecuatorianos.

En el período 2006-2015, los investigadores ecuatorianos han producido 921 MCs y 4910 artículos. La proporción de MCs respecto al total de publicaciones ecuatorianas es del 14% para el período en estudio. La producción de MCs y artículos ha crecido durante los últimos años, sin embargo, el crecimiento es mayor para las MCs (Figura 1). Se publicaron 35

**Figura 1.** La tendencia de la producción de memorias de congresos y artículos científicos por investigadores ecuatorianos para el período 2006-2015.



MCs en el año 2006, que contrasta con las 377 MCs publicadas en el año 2015. Para el caso de los artículos, en el año 2006 se publicaron 226 y 1105 en el año 2015. Esto indica un aumento relativo importante en el número de MCs (10,8 veces) en comparación con el número de artículos (4,9 veces). La razón del aumento en el número de MCs podría estar directamente vinculada a las regulaciones recientemente establecidas por la SENESCYT, que anima a los investigadores a participar en conferencias y reuniones científicas (ver más adelante la sección 'Implicaciones para la política pública').

Para tener un punto de comparación, se consideró la producción de MCs en otros países latinoamericanos (Figura on line 1). Se consideró el número de MCs como aproximación para estimar la participación de los investigadores en congresos científicos. En este análisis, Brasil es el país líder con una producción que duplica la del siguiente país de la lista (México). Los países vecinos del Ecuador, Colombia y Perú, exhiben mayor participación en conferencias, siendo la práctica colombiana 10 veces más que la ecuatoriana a lo largo de los años que contempla este estudio. Sin embargo, los recientes esfuerzos de la SENESCYT y sus políticas de incentivo para la participación en congresos científicos han tenido frutos. Un análisis de la producción ecuatoriana de MCs para el año 2015 indica que el país ha superado a algunos países vecinos (Venezuela, Uruguay y Perú) que anteriormente tenían mayor producción que el Ecuador, pero ahora están detrás (Figura on line 1).

De los 921 MCs producidos por el Ecuador, 834 fueron escritos en inglés (92%) y 95 en español (10%), siendo el resto de los idiomas portugués, francés e italiano. Por otro lado, las principales áreas temáticas de las conferencias en las que participaron investigadores ecuatorianos se muestran en la Figura 2. El conocido sesgo<sup>3, 1, 22</sup> se reproduce en los MCs ecuatorianos, ya que los campos más prolíficos son Ciencias de la Computación e Ingeniería, seguidos por los demás campos, pero en menor medida. Los dos campos principales representan más del 90% de las MCs ecuatorianas. Esto implica que los informáticos e ingenieros ecuatorianos son tan prolíficos en participar en conferencias como sus colegas internacionales.

Desde un punto de vista de interés local, se analizó la participación de investigadores ecuatorianos en conferencias de acuerdo a su afiliación universitaria. Las instituciones ecuatorianas con mayor participación en conferencias científicas son 14 universidades de las cuales ocho son instituciones financia-

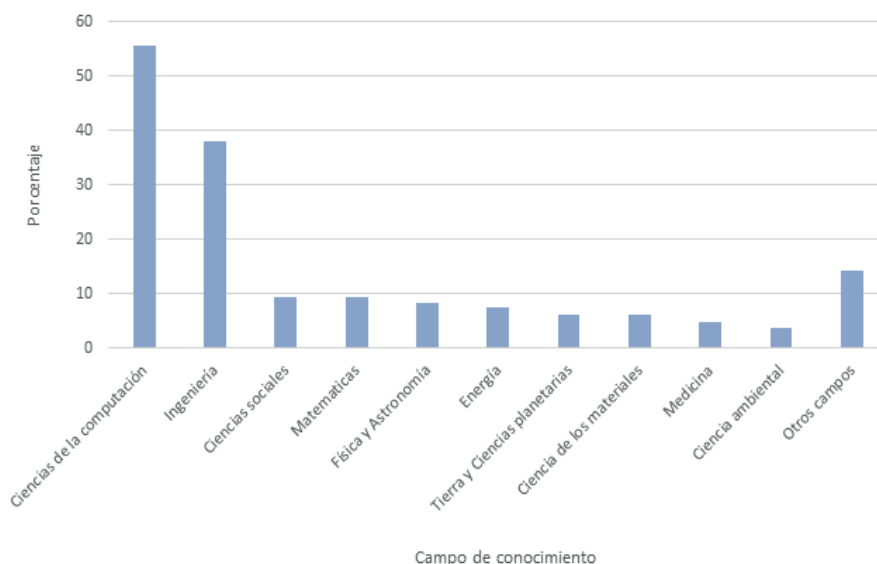
das públicamente y siete privadas (Figura on line 2). Las tres primeras universidades de esta lista son: la Escuela Superior Politécnica del Litoral, la Universidad de las Fuerzas Armadas y la Universidad Politécnica Salesiana, las dos primeras pertenecen al sistema público de las universidades ecuatorianas y la tercera es una institución académica de gestión privada. Entre las instituciones privadas se encuentra la Agencia Espacial Civil Ecuatoriana que no es una universidad sino un organismo civil independiente que realiza investigaciones científicas sobre las ciencias planetarias y espaciales y fomenta el desarrollo de la ciencia en el sistema educativo del país. Estos datos son informativos para definir la asignación futura de fondos de las organizaciones públicas nacionales (por ejemplo, SENESCYT) a las universidades para fortalecer la investigación en el Ecuador.

### Internacionalización y colaboración internacional

La internacionalización de la ciencia es un tema estratégico para los países, las instituciones públicas, las universidades y los centros de investigación. Las instituciones de investigación buscan fomentar la investigación colaborativa, a menudo interdisciplinaria, sinérgica e internacional. La participación activa de los investigadores en eventos internacionales es altamente alentada, y particularmente dirigida a investigadores de países pequeños como el Ecuador que intentan aumentar su desempeño científico. ¿Qué tan extendida está la participación de científicos ecuatorianos en las conferencias internacionales? Para responder esta pregunta, se inicia el análisis haciendo una revisión de las principales regiones y países del mundo donde los científicos ecuatorianos presentan sus trabajos de investigación. La Figura 3 presenta una relación de las regiones donde se han llevado a cabo congresos científicos en los cuales los investigadores ecuatorianos han presentado sus trabajos. Un tercio de las conferencias tuvieron lugar en América Latina, probablemente debido a que se comparte el mismo idioma y la cercanía con el Ecuador. Por el contrario, el 66,8% de las conferencias fueron llevadas a cabo en otros continentes. Un análisis a nivel de país indica que las conferencias llevadas a cabo en Estados Unidos y en el Ecuador fueron los eventos científicos preferidos por los investigadores ecuatorianos (Figura on line 3).

En términos generales, la colaboración internacional ha impactado favorablemente a la ciencia en el Ecuador<sup>16</sup>. Para

**Figura 2.** Relación de las MCs de acuerdo a los principales campos de conocimiento. 'Otros campos' refiere a los siguientes: Ingeniería Química, Ciencias Agrícolas y Biológicas; Bioquímica, Genética y Biología Molecular; Negocios, Gestión y Contabilidad; Ciencias de la Decisión; Química; Profesiones de la salud; Artes y Humanidades; Inmunología y Microbiología; Multidisciplinario; Neurociencia; Farmacología, Toxicología y Farmacéutica; Economía, Econometría y Finanzas; Odontología; Enfermería; Psicología.



el caso particular de la producción de MCs, ¿cómo ha influido la colaboración internacional? La hipótesis de trabajo que se ha utilizado plantea que los científicos extranjeros han incentivado a los colegas ecuatorianos a que participen en conferencias internacionales (no ecuatorianas, no latinoamericanas). Esta hipótesis surge al examinar los datos presentados anteriormente, que la mayoría de las conferencias (66,8%) en las que los científicos ecuatorianos participaron tuvieron lugar en otros continentes diferentes a Latinoamérica. Para probar esta posibilidad, se siguió un razonamiento inverso, es decir, se analizaron las MCs producidas por investigadores ecuatorianos sin ninguna colaboración de autores internacionales para averiguar el lugar (país) donde ellos presentaron sus trabajos. Los resultados indican que 281 MCs fueron producidas por investigadores ecuatorianos sin colaboración internacional. De éstos, 126 documentos (44,8%) fueron producidos en conferencias ubicadas en países de habla hispana (Tabla on line 1). Si se incluye a países de lengua portuguesa en el cálculo, como Brasil, un país vecino del Ecuador, este porcentaje aumenta a 52,7%. Este resultado sugiere que los investigadores ecuatorianos prefieren participar en eventos organizados en el Ecuador o en países con lenguaje similar (es decir, países de América Latina, España y Portugal). Otros aspectos que podrían haber influido en seleccionar estos países son la proximidad geográfica (por tanto, reducción de costos de viajes) y la similitud de cultura y círculos institucionales comunes. Aunque la producción científica de América Latina ha estado creciendo durante los últimos años y tiene mucho potencial de desarrollo científico y tecnológico, no se considera a este continente como la región líder en el mundo en generación de conocimiento científico y avances tecnológicos<sup>18</sup>. Lo contrario ocurre con algunos países ubicados en América del Norte, Europa y Asia, que ocupan los primeros lugares en productividad científica<sup>23</sup>. La tendencia de los investigadores ecuatorianos a participar en conferencias localizadas en América Latina representa una debilidad y al mismo tiempo una oportunidad para la SENESCYT de fomentar una internacionalización más profunda a través de políticas públicas que se centren principalmente en países y regiones

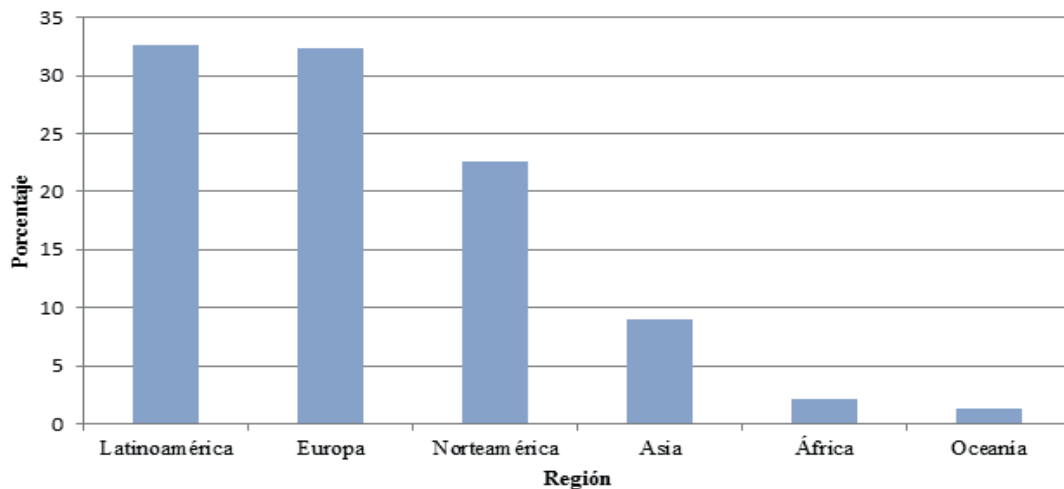
donde el desarrollo científico y el progreso tecnológico son mayores.

Como se dijo anteriormente, en general, la colaboración internacional tuvo una tremenda influencia en la productividad científica del Ecuador. Para tener una mejor estimación del grado de participación de los investigadores internacionales en las conferencias presentadas por los científicos ecuatorianos, se ha analizado la coautoría de las MCs. El 69% de las MCs fueron producidas con la participación de socios internacionales. En otras palabras, el 30,5% de las MCs fueron producidas exclusivamente por investigadores ecuatorianos, cifra que supera el 15,8% de los artículos publicados por ellos durante el período de este estudio (Figura on line 4). Este resultado indica que la alianza con colegas internacionales tiene un fuerte estímulo sobre todo cuando se trata de escribir y publicar artículos. Se puede deducir también que los investigadores ecuatorianos están más dispuestos a participar en conferencias quizás porque son una forma más simple y rápida de tener publicaciones reconocidas por el sistema nacional. Castillo y Powell<sup>19</sup> analizaron la productividad científica ecuatoriana utilizando datos de todo tipo de documentos científicos en su conjunto. Sus resultados indican que el 80% de los documentos científicos fueron producidos como resultado de la interacción con la colaboración internacional. El análisis más profundo realizado en este trabajo sugiere que los investigadores ecuatorianos son menos dependientes de la colaboración internacional cuando se trata de participar en conferencias, pero lo contrario parece ser cierto en la publicación de artículos en revistas científicas.

#### Impacto científico y relevancia

Gonzales-Albo y Bordons<sup>24</sup> y Zhang y Glänzel<sup>25</sup> han hecho una distinción de las MCs según el tipo de documento donde han sido publicadas: libros de memorias (monografías que muestran resultados de conferencias) o revistas científicas. Esta diferencia es importante, ya que, de acuerdo a estos autores, las MCs publicadas en libros de memorias reciben menos citas que las publicadas en números ordinarios de revistas científicas. Existe una tercera vía de publicación formal, las

**Figura 3.** Lugar geográfico (regiones) de las conferencias científicas en las que participaron investigadores ecuatorianos, en porcentaje.



series o colecciones de libros, que es reconocida por el sistema de búsquedas de Scopus. Se realizó un análisis de las MCs ecuatorianas de acuerdo al tipo de documento de publicación. Los resultados muestran que el número total de libros de memorias es de 749, lo que representa el 82,5% de todas las MCs producidas por investigadores ecuatorianos con o sin colaboración internacional (Figura on line 5). Las MCs publicadas en series de libros y revistas corresponden al 8,9% y al 8,6%, respectivamente. Los libros de memorias recibieron el menor impacto medido por el indicador SJR en comparación con los otros dos tipos de formatos de publicación. De hecho, en promedio, los trabajos publicados en revistas recibieron el mayor impacto, es decir, 4,7 y 2,8 veces más que las MCs publicadas en libros de memorias y en series de libros, respectivamente (Figura 4). Este resultado confirma los hallazgos mencionados por otros autores<sup>24, 25</sup> que indican que las MCs publicadas en formato de libros de memorias reciben, en promedio, menos citas que las MCs en revistas científicas.

Además, analizamos el impacto científico de las MCs en comparación con artículos publicados en revistas científicas. Para ello, utilizamos dos análisis de datos: citas totales y valores del indicador SJR que las MCs y los artículos recibieron durante el periodo de estudio. La Figura 5 resume los resultados obtenidos para las citas. Como era de esperar, los artículos recibieron un número mucho mayor de citas que las MCs. En promedio, los artículos recibieron 13,3 citas en comparación con 1,3 citas recibidas por MCs para el período 2006-2015. Este resultado debe tomarse con precaución ya que los documentos de los últimos años no han alcanzado el nivel máximo de citas, por lo que el impacto de estas publicaciones sigue siendo impreciso. En cualquier caso, se espera que el número de citas irá en aumento tanto para los artículos como para las MCs siguiendo una tendencia similar a la que se muestra en la figura 5. La desviación estándar de los promedios de citas es alta, principalmente debido a que hay artículos con un número alto de citas y artículos sin ninguna cita. Por lo tanto, se realizó un análisis más profundo sobre las citas que las MCs y los artículos recibieron con el fin de comprender la diferencia de impacto de citas entre estos dos tipos de documentos científicos. Veintisiete por ciento de las MCs y 79,5% de los artículos fueron citados al menos una vez. De todas las MCs citadas, 92% fueron citadas 10 veces o menos, 7% fueron citadas más de 10 veces, 0,8 fueron citadas más de 50 veces (2 documentos de 246) y no hay MCs con más de 100 citas (Figura on line

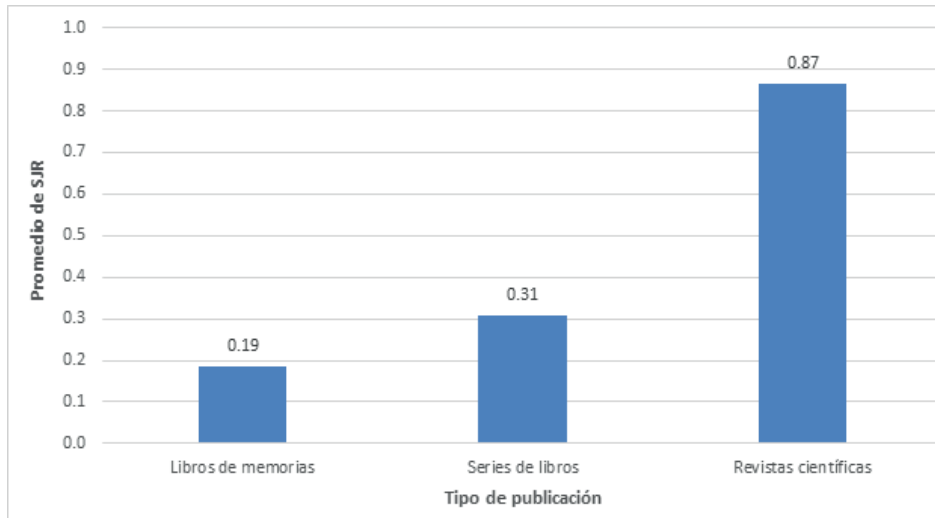
6). Por su lado, los artículos recibieron muchas más citas. El 0,2% de los artículos (7 de 3872) recibieron más de 500 citas, el 2% recibieron entre 100 y 500 citas y el 4% entre 51 y 100 citas. El valor que quizás es más útil para esta comparación es el segmento 11 a 50 citas: 30% para artículos frente al 7% para MCs. La diferencia de impacto de citas entre los dos tipos de documentos es muy obvia.

El mayor impacto científico de los artículos con respecto a las MCs se confirma con el análisis de la puntuación del indicador SJR. Como se dijo anteriormente, el indicador SJR mide la influencia científica y el prestigio de publicaciones académicas, siendo un cálculo basado en el número de citas y en la importancia de las revistas donde han sido publicadas. Los valores de SJR son más altos para artículos que para las MCs de todos los años estudiados en este trabajo (Figura 6). Los valores medios de SJR de los artículos significan 3,13 veces más altos que los valores de las MCs. Hay un aumento inusual en la puntuación SJR para el año 2008 en la curva correspondiente a artículos; esto se debe al hecho de que este año se publicó un mayor número de artículos en revistas de alto impacto (33 artículos en *Physical Review Letters*, 4 en *Science* y 2 en *The Lancet*). Situación similar ocurrió para la curva de MCs para el año 2013, donde una memoria fue publicada en un número regular de una revista de alto nivel (Boletín de la *American Meteorological Society*). Los resultados de ambos análisis (es decir, el número de citas y el indicador SJR) coinciden y están en clara concordancia con otros estudios que indican que el impacto de las revistas de artículos es significativamente más alto que el impacto de las MCs<sup>24, 25</sup>.

### Implicaciones para la política pública

En este trabajo se estudió la participación de investigadores ecuatorianos en conferencias y reuniones científicas internacionales en el lapso de 10 años (2006-2015). Se utilizó el número de MCs como una aproximación para estimar la participación de investigadores y científicos ecuatorianos en los congresos y conferencias. Aunque la participación de investigadores ecuatorianos en estos eventos es relativamente baja, durante el período de estudio se observó un impresionante aumento de participación (mayor número de MCs), que es superior al aumento de artículos publicados en revistas académicas. Este aumento podría deberse a la puesta en vigor de un nuevo reglamento por parte de la SENESCYT en 2013 que esa dirigida a incrementar la calidad del trabajo realizado por los

**Figura 4.** Valores promedio del indicador SJR recibido por los diferentes tipos de publicaciones donde los investigadores ecuatorianos publicaron sus memorias de congresos. Los números encima de las barras indican los valores medios de SJR para cada tipo de documento.



**Figura 5.** Número de citas recibidas por artículos y por MCs producidos por investigadores ecuatorianos solos o en colaboración con socios internacionales.

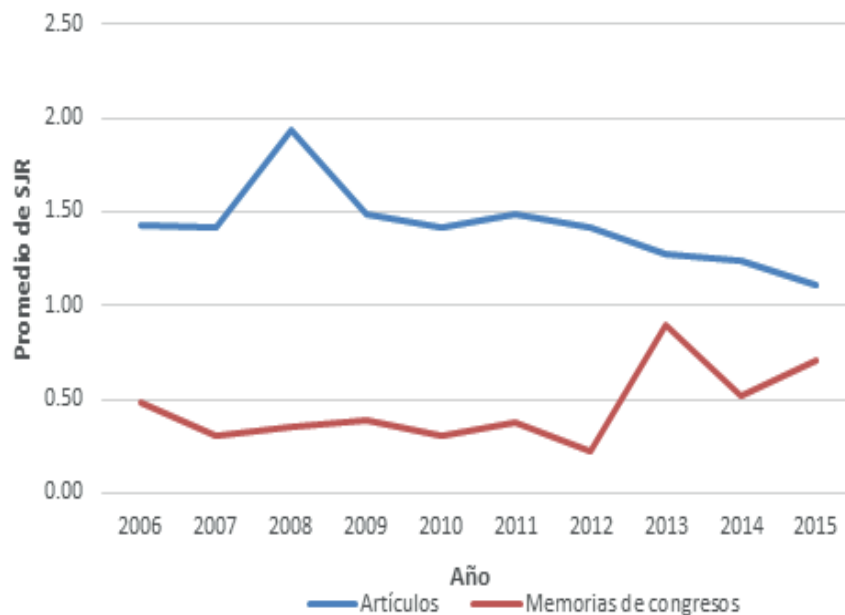


investigadores que trabajan en el Ecuador<sup>26</sup>. Este reglamento busca evaluar el desempeño de los investigadores con el fin de promoverlos a categorías mayores lo que implica incremento de salario. Entre los diferentes tipos de documentos científicos que son reconocidos oficialmente por este reglamento están las memorias de congresos, conferencias y reuniones científicas. Dado que el trabajo científico presentado en conferencias suele consistir en material preliminar o producto de investigación en una etapa incompleta que luego será terminado<sup>7</sup>, la participación en congresos se convierte en una tarea relativamente más fácil que la preparación y publicación de artículos científicos. Probablemente por esta razón, los investigadores ecuatorianos prefieren participar en conferencias y, por lo tanto, obtener documentos reconocidos por el sistema científico ecuatoriano que son útiles para ganar promoción hacia categorías superiores. Sin embargo, puede haber otras razones que impulsaron a los investigadores ecuatorianos durante los recientes años a participar más activamente en congresos y conferencias científicas.

Este reglamento<sup>26</sup> cumplió parcialmente sus objetivos. Alentó a los investigadores ecuatorianos a participar en un número mayor de conferencias internacionales, lo que les ha brindado oportunidades de interacción con colegas y expertos en la misma disciplina, estimular el debate y el intercambio de ideas, presentar el trabajo de investigación para recibir comentarios y quizás lo más importante a participar en reuniones de clase mundial (a las cuales los investigadores ecuatorianos generalmente no tienen acceso o no están acostumbrados a participar). Sin embargo, de acuerdo con este estudio, este reglamento tiene algunos inconvenientes que necesitan ser resueltos. Mencionemos algunos: 1) Los investigadores ecuatorianos -sin considerar la colaboración internacional- se inclinan a participar en reuniones celebradas en el Ecuador o en países latinoamericanos, perdiendo así la posibilidad de interactuar con colegas de países más desarrollados en términos de investigación científica. La razón más probable de este sesgo es el bajo nivel de dominio del idioma inglés de los colegas ecuatorianos. Quiérase o no, el inglés es el idioma que más se



**Figura 6.** Valores promedio de SJR recibidos por artículos y por MCs producidos por investigadores ecuatorianos solos o en colaboración con socios internacionales.



utiliza en el mundo científico<sup>27</sup> y el dominio de este idioma por parte de los científicos ecuatorianos es bajo<sup>28</sup>. Dado que en los congresos los científicos deben relacionarse verbalmente, una limitación en el idioma es algo que desmotiva la participación en eventos donde se habla principalmente inglés. Las instituciones públicas nacionales deben ayudar a superar los problemas de idioma y de esta manera fomentar la participación de los investigadores en conferencias que se celebren en países que son líderes en ciencia. 2) Al parecer los investigadores ecuatorianos están haciendo más hincapié en la participación en congresos que en la publicación de artículos. Al menos esta tendencia se observa en los últimos años. Cabe señalar que ambos tipos de documentos son parte de las actividades académicas, sin embargo, como se prueba aquí, los artículos reciben muchas más citas que las MCs. Por lo tanto, se obtiene un mayor impacto con los artículos que con las MCs (con ciertas excepciones para los campos de computación, informática, ingeniería, etc). Esto no es inusual, ya que la evidencia encontrada por diferentes autores indica que las MCs tienen un impacto relativamente menor en comparación con el impacto de los artículos<sup>2, 24, 25</sup>. La institución pública de ciencia y tecnología (SENESCYT) debe definir o ajustar la política actual para alentar a los investigadores a dar prioridad a la publicación de artículos sobre las MCs. Esta política debe ir acompañada de cambios complementarios encaminados a reducir el papeleo, aumentar la estabilidad laboral y asegurar una provisión constante de fondos para la investigación a largo plazo. 3) Si bien la investigación científica global tiende a la colaboración internacional debido a sus probados beneficios (mayor calidad de la investigación<sup>29</sup> y difusión más rápida del conocimiento científico<sup>30</sup>), es común encontrar en los países en desarrollo un desequilibrio en la relación entre el socio que ofrece la experiencia científica y el receptor. En gran medida, esta relación desigual impide un crecimiento saludable de la contraparte menos desarrollada estableciendo una relación de dependencia y, en casos extremos, el socio extranjero llega a controlar a los colaboradores de los países en desarrollo<sup>31</sup>. La política pública debe orientarse hacia una mayor participación de los científicos nacionales y locales en todo el proceso de investigación colaborativa, una mayor participación de las partes interesadas y los actores

sociales y un esquema ascendente para desarrollar ideas y proyectos de investigación<sup>32</sup>. Para el caso ecuatoriano, aunque las instituciones nacionales tienen escaso control sobre estas relaciones desiguales, es necesario establecer políticas claras hacia una asociación más igualitaria. La SENESCYT ha estado trabajando en varios documentos legales para normalizar la colaboración internacional, sin embargo, todavía es necesario trabajar en documentos adecuadamente ajustados (Acuerdos Marco de Cooperación, Acuerdos de Transferencia Mutua, Memorandos de Entendimiento, Consentimiento Libre, Previo e Informado y otros) dirigidos a equilibrar las relaciones de colaboración. Esto proporcionará una base más sólida para implementar una relación más equitativa de investigadores ecuatorianos con sus colegas extranjeros. Sin embargo, las regulaciones legales establecidas por SENESCYT u otras instituciones nacionales deben ser lo suficientemente flexibles, evitando asfixiar la investigación científica.

## Conclusiones

Se puede concluir que las MCs, como parte integral de la difusión científica actual, son importantes para el Ecuador, y la tendencia al alza del número de MCs es favorable y conveniente. La experiencia ecuatoriana sigue la tendencia mundial, con gran énfasis en campos de la informática, ciencias de la computación e ingeniería. Los tomadores de decisiones nacionales deben continuar fomentando la participación de los investigadores ecuatorianos en conferencias internacionales, pero deben introducir ciertos ajustes en las políticas públicas para evitar dejar de lado la publicación de artículos en revistas académicas. Es un reto para las autoridades nacionales y universitarias encontrar el equilibrio entre alentar a los investigadores a participar en conferencias internacionales de alto nivel y promover la publicación de artículos. Sin embargo, desde la perspectiva del impacto científico, es definitivamente mejor para el Ecuador publicar artículos en vez de MCs.

## Agradecimientos

El autor agradece la valiosa ayuda de Helen Guigues en

el procesamiento de los datos y de María Luisa Morales en la edición gramatical del documento. Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el Proyecto Prometeo de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, República del Ecuador.

The author is appreciative of the valuable help of Helen Guigues for data mining and María Luisa Morales for text editing. This work has been partially funded by the Prometheus Project of the "Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación", Republic of Ecuador.

### Conflictos de interés

El autor declara no tener conflicto de intereses. Las opiniones vertidas en este trabajo son responsabilidad del autor y no reflejan necesariamente la posición oficial de la Universidad Yachay Tech.

### Referencias bibliográficas

1. Glänzel, W.; Schlemmer, B.; Schubert, A. y Thijs, B. (2006). Proceedings literature as additional data source for bibliometric analysis. *Scientometrics*, 68(3), 457-473.
2. Lisée, C.; Larivière, V. y Archambault, E. (2008). Conference proceedings as a source of scientific information: A bibliometric analysis. *Journal of the American Society for Information Science and Technology*, 59(11), 1776-1784.
3. Goodrum, A.A.; MacCain, K.W.; Lawrence, S. y Giles, C.L. (2001). Scholarly publishing in the Internet age: A citation analysis of computer science literature. *Information Processing and Management*, 37(5), 661-675.
4. Patterson, D.; Snyder, L. y Ullman, J. (1999). Best practice memo: evaluating computer scientists and engineers for promotion and tenure. [http://www.cra.org/uploads/documents/resources/bp-memos/tenure\\_review.pdf](http://www.cra.org/uploads/documents/resources/bp-memos/tenure_review.pdf) [10 de Junio de 2017]
5. Franceschet, M. (2010). The role of conference publications in CS. *Communications of the ACM*, 53(12), 129-132.
6. Meyer, B.; Choppy, C., Staunstrup, J. y van Leeuwen, J. (2009). Research Evaluation for Computer Science. *Communications of the ACM*, 52(4), 31-34.
7. Drott, M.C. (1995). Reexamining the role of conference papers in scholarly communication. *Journal of the American Society for Information Science*, 46(4), 299-305.
8. Loyola, R.D.; Diniz-Filho, J.A. y Bini, L.M. (2012). Obsession with quantity: a view from the south. *Trends in Ecology & Evolution*, 27, 585-8.
9. Van Hoof, H.B. (2015). Ecuador's Efforts to Raise Its Research Profile: The Prometeo Program Case Study. *Journal of Hispanic Higher Education*, 14(1), 56-68.
10. Johnson, M.A. (2017). Contemporary Higher Education Reform in Ecuador: Implications for Faculty Recruitment, Hiring, and Retention. *Education Policy Analysis Archives*, 25(68), 1-16.
11. Medina, J.; Cordero, L.; Carrillo, P.; Rodríguez, D.; Castillo, J.A.; Astudillo, I.; Cárdenas, S.; De Trinidad, E. y Powell, M. (2016). Investigación Científica. En: Ramírez, R. (ed). *Universidad urgente para una sociedad emancipada*. pp 461-494. SENESCYT-IESALC, Quito, Ecuador.
12. Masson, J.L. (2008). Measures of Science & Technology in Ecuador. [<https://mpra.ub.uni-muenchen.de/12691/>] [5 de Junio de 2017]
13. Ayala Mora, E. (2015). La investigación científica en las universidades ecuatorianas. *Anales*, 57, 61-72.
14. Mesa Fleitas, M.E. (2015). Gestión y visibilidad de las publicaciones científicas en Ecuador. *Ecos de la Academia*, Num.2-art.9.
15. Sisa, I.; Espinel, M.; Fornasini, M. y Mantilla, G. (2011). La producción científica en ciencias de la salud en Ecuador. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 30:388-92.
16. Alvarez-Muñoz, P. y Pérez-Montoro, M. (2015). Análisis de la producción y de la visibilidad científica de Ecuador en el contexto Andino (2000-2013). *El profesional de la información*, 24, 577-586.
17. Loor, F. y Carriel, V. (2014). Investigación y desarrollo en Ecuador: un análisis comparativo entre América Latina y el Caribe (2000 - 2012). *Compendium*, 1, 28-46.
18. Lemarchand, G.A. (2015). Latin America. In: UNESCO Science Report: towards 2030. Paris pp. 174-209.
19. Castillo, J.A. y Powell, M.A. (2018). Research productivity, quality and international collaboration: a study of Ecuadorian science. En proceso de revisión por una revista especializada.
20. Guerrero-Bote, V.P. y Moya-Anegón F. (2012). A further step forward in measuring journals' scientific prestige: The SJR2 indicator. *Journal of Informetrics*, 6(4), 674-688.
21. Falagas, M.E.; Kouranos, V.D.; Arcencibia-Jorge, R. y Karageorgopoulos, D.E. (2008). Comparison of SCImago journal rank indicator with journal impact factor. *FASEB Journal*, 22(8), 2623-8.
22. Vrettas, G. y Sanderson, M. (2015). Conferences versus journals in computer science. *Journal of the Association for Information Science and Technology*, 66(12), 2674-2684.
23. Nature Index. (2016). Tables, Top countries. <http://www.natureindex.com/annual-tables/2016/country/all> [10 de Junio de 2017]
24. González-Albo, B. y Bordons, M. (2011). Articles vs. proceedings papers: Do they differ in research relevance and impact? A case study in the library and information science field. *Journal of Informetrics*, 5(3), 369-381.
25. Zhang, L. y Glänzel, W. (2012). Proceeding papers in journals versus the "regular" journal publications. *Journal of Informetrics*, 6(1), 88-96.
26. Gobierno del Ecuador. (2013). Reglamento para la Acreditación, Inscripción y Categorización de Investigadores Nacionales y Extranjeros. Registro oficial, N° 172. <https://www.registroficial.gob.ec/index.php/registro-oficial-web/publicaciones/registro-oficial/item/2231-registro-oficial-no-172.html> [5 de Junio de 2017]
27. Drubin, D.G. y Kellogg, D.R. (2012). English as the universal language of science: opportunities and challenges. *Molecular Biology of the Cell*, 23(8), 1399.
28. EF-Education First, (2017). English Proficiency Index. <http://www.ef.com/epi/regions/latin-america/ecuador/> [5 de Junio de 2017].
29. Frenken, K.; Hölzl, W. y de Vor, F. (2005). The citation impact of research collaborations: The case of European biotechnology and applied microbiology (1988-2002). *Journal of Engineering and Technology Management*, 22, 9-30.
30. Singh, J. (2005). Collaborative networks as determinants of knowledge diffusion patterns. *Management Science*, 51(5), 756-770.
31. Boshoff, N. (2009). Neo-colonialism and research collaboration in Central Africa. *Scientometrics*, 81(2), 413-434.
32. Habel, J.C.; Eggermont, H.; Günter, S.; Mulwa, R.K.; Rieckmann, M.; Koh, L.P.; Niassy, S.; Ferguson, J.W.H.; Gebremichael, G.; Githiru, M.; Weisser, W.W. y Lens, L. (2014). Towards more equal footing in north-south biodiversity research: European and sub-Saharan viewpoints. *Biodiversity and Conservation*, 23(12), 3143-8.

Recibido: 13 noviembre 2017

Aprobado: 20 enero 2018

## RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

### Presencia de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en especies representativas del bosque seco tropical del litoral ecuatoriano.

### Presence of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in representative species of the tropical dry forest of the Ecuadorian coast.

Ivette Chiquito Noboa, Jaime Naranjo Morán & Milton Barcos-Arias

DOI. 10.21931/RB/2018.03.01.7

524

**Resumen:** Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son microorganismos que mantienen una relación simbiótica mutualista con las raíces de las plantas. El bosque seco tropical contiene abundantes especies de interés silvícola, sin embargo, en Ecuador se desconoce las relaciones simbióticas de los HMA con los árboles que representan el bosque seco. El propósito de este estudio fue aislar e identificar la presencia de HMA en determinadas especies vegetales de este nicho ecológico del Ecuador. Las muestras de suelo y raíces se recolectaron en la época húmeda entre los meses de marzo y abril del 2017. Los porcentajes de micorrización encontrados fueron los siguientes: *Cochlospermum vitifolium* (Bototillo) 80.8%, *Triplaris cumingiana* (Fernán Sánchez) 71.7%, *Albizia multiflora* (Compoño) 70.0%, *Tecoma castanifolia* (Moyuyo de montaña) 68.6%, *Bursera graveolens* (Palo Santo) 68.3%, *Sapindus saponaria* (Jaboncillo) 67.5%, *Croton wagneri* (Purga) 65.0%, *Ceiba trichistandra* (Ceibo) 62.2%. Todas las plantas muestreadas presentaron una densidad media de esporas por 100 gr de suelo, pero *Triplaris cumingiana* (Fernán Sánchez) obtuvo una mayor esporulación a pesar de presentar la misma densidad media.

**Palabras clave:** Bosque seco, Micorrizas arbusculares, Simbiosis.

**Abstract:** Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are microorganisms that maintain a symbiotic mutualist relationship with the roots of plants. The tropical dry forest contains abundant species of silvicultural interest, however, the symbiotic relationships of the AMF with the trees that represent the dry forest are unknown. The purpose of this study was to isolate and identify the presence of AMF in certain plant species of this ecological niche in Ecuador. Soil and root samples were collected in the wet season between March and April of 2017. The percentages of mycorrhizal found were as follows: *Cochlospermum vitifolium* (Bototillo) 80.8%, *Triplaris cumingiana* (Fernán Sánchez) 71.7%, *Albizia multiflora* (Compoño) 70.0%, *Tecoma castanifolia* (Moyuyo de montaña) 68.6%, *Bursera graveolens* (Palo Santo) 68.3%, *Sapindus saponaria* (Jaboncillo) 67.5%, *Croton wagneri* (Purga) 65.0%, *Ceiba trichistandra* (Ceibo) 62.2%. All plants sampled had an average density of spores per gram of soil, but *Triplaris cumingiana* (Fernán Sánchez) obtained higher sporulation despite having the same average.

**Keywords:** Dry forest, Arbuscular mycorrhizae, Symbiosis.

## Introducción

Ecuador cuenta con ecosistemas de bosques secos pluviestacionales ubicados en la región tumbesina. Su diversidad florística comprende el 80% de plantas endémicas regionales<sup>1</sup>. Dentro de la clasificación de las especies vegetales representativas del bosque seco del Ecuador tenemos: *Albizia multiflora* (Compoño), *Ceiba trichistandra* (Ceibo), *Sapindus saponaria* (Jaboncillo), *Tecoma castanifolia* (Moyuyo de montaña), *Bursera graveolens* (Palo Santo), *Cochlospermum vitifolium* (Bototillo), *Croton wagneri* (Purga) y *Triplaris cumingiana* (Fernán Sánchez). La mayoría de estas especies hacen simbiosis con un gran número de microorganismos del suelo. Siendo uno de los más importantes los hongos micorrízicos arbusculares ya que ayudan incrementando la absorción de nutrientes esenciales permitiendo la supervivencia en época seca entre otros beneficios ecosistémicos<sup>6</sup>, tal como ha sido evidenciado en las especies de samán (*Albizia saman*) y piñon (*Jatropha curcas*)<sup>3,9</sup>.

El experimento se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Biotecnologías del Ecuador (CIBE) en Guayaquil (Ecuador) durante los meses de marzo y abril del año 2017. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar la presencia de HMA en especies vegetales representativas del bosque seco tropical

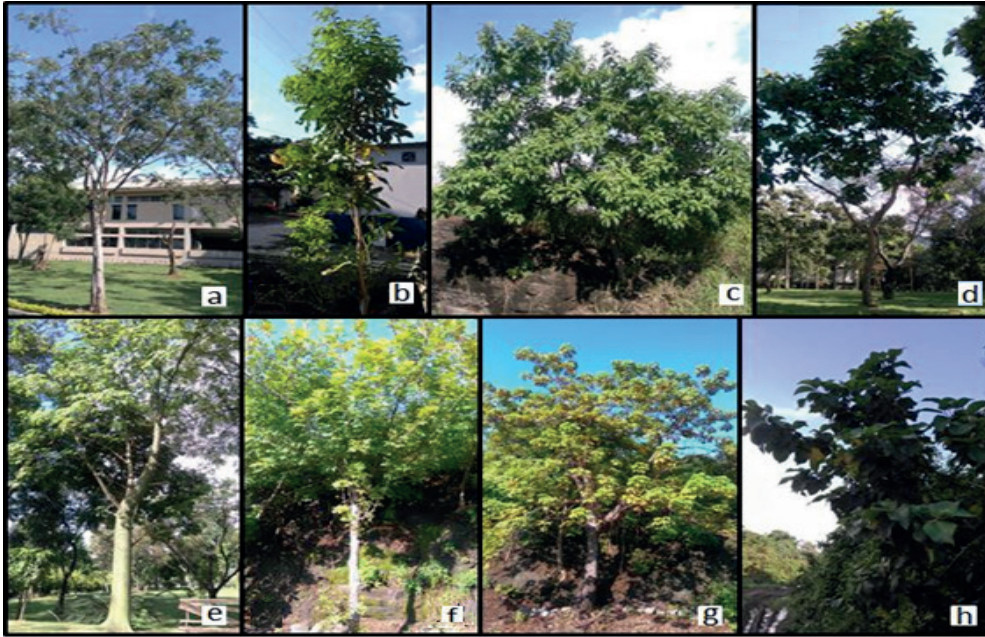
del Ecuador. Para su observación se tomaron muestras de suelo y raíces de 3 diferentes zonas establecidas al azar para cada especie de planta, Fig. 1. Cada muestra se extrajo a una profundidad de 20 cm, tomando 1 kg de suelo y 50 g de raíces

Para realizar el aislamiento y conteo de esporas se usó el método de tamizado (tamices de 250 y 40  $\mu$ m) y decantación en húmedo con centrifugación acorde a la metodología de Nicholson y Gerderman<sup>4</sup>. El criterio para cuantificar la densidad de esporas de cada suelo fue, bajo: < 1 espora/ g de suelo, medio: 1 – 10 esporas/ g de suelo y alto: > 10 esporas/ g de suelo<sup>8</sup>. Mientras que para la identificación de HMA en las raíces se utilizó el método de tinción con azul de tripano según el procedimiento de Chauhan<sup>2</sup>, y el porcentaje de colonización micorrízica se utilizó el procedimiento de Steel y Torrie<sup>5,7</sup>, Fig. 2.

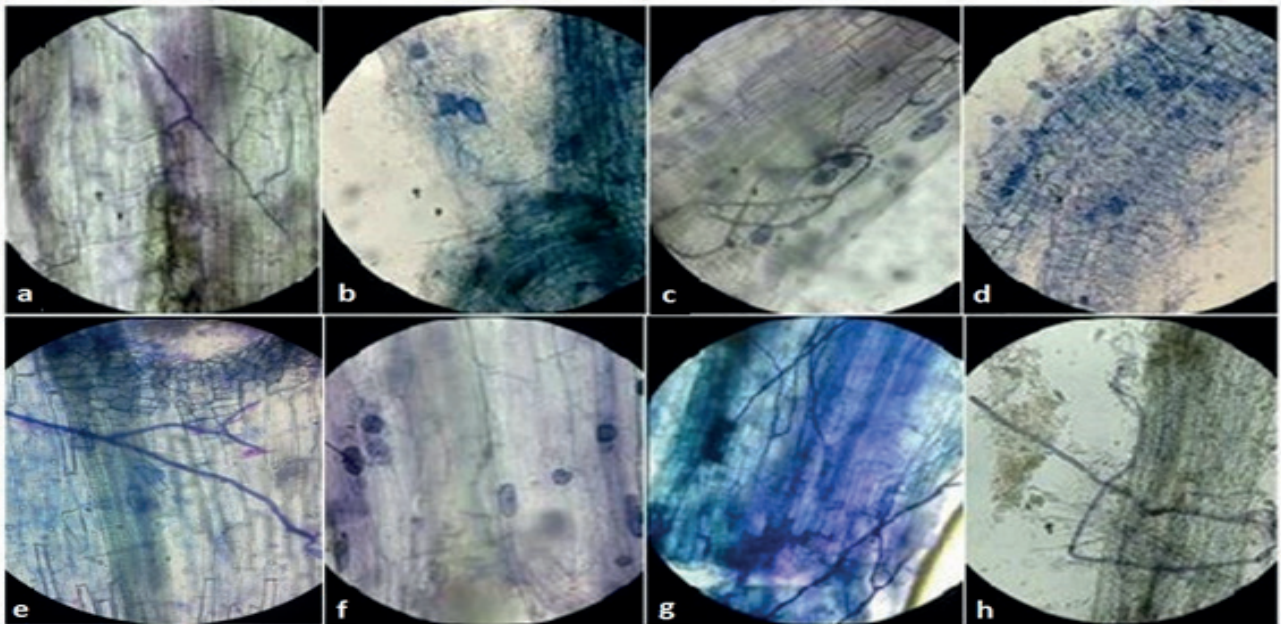
## Resultados

Se pudo evidenciar que existe presencia de micorrización en todas las raíces de las especies estudiadas tal como se aprecian en la figura 2. Los porcentajes de colonización micorrízica total fueron: Amu 70.0%, Ctr 62.2%, Tca 68.6%, Ssa 67.5%, Bgr 68.3%, Cvi 80.8%, Cwa 65.0%, Tcu 71.7%. Todas

**Figura 1.** Especies evaluadas: a) *A. multiflora*, b) *S. saponaria*, c) *T. castanifolia*, d) *T. cumingiana*, e) *C. trichistandra* f) *B. graveolens*, g) *C. vitifolium*, h) *C. wagneri*.



**Figura 2.** Presencia de HMA en raíces micorrizadas: a) Bototillo, b) Ceibo, c) Compoño, d) Fernán Sánchez, e) Jaboncillo, f) Moyuyo de montaña, g) Purga, h) Palo Santo.



Las plantas muestreadas presentaron una densidad media de esporas por gramo de suelo, tal como se observa en la tabla 1, sin embargo, *Triplaris cumingiana* (Tcu) obtuvo mayor esporulación a pesar de tener densidad media.

## Conclusiones

La simbiosis establecida entre HMA y las especies nativas seleccionadas del bosque seco tropical podrían estar favoreciendo la supervivencia de estas plantas en la época seca.

De las especies estudiadas Bototillo (*Cochlospermum vitifolium*) destaca en el porcentaje de micorrización, mientras

**Tabla 1.** Porcentaje de micorrización y promedio de esporulación en especies forestales del bosque seco tropical del Ecuador.

Especie	PROM	E/GR S	DENSIDAD	% MICO
<i>Albizia multiflora</i>	197	2	media	70,0
<i>Ceiba trichistandra</i>	289	3	media	62,2
<i>Tecoma castanifolia</i>	129	1	media	68,6
<i>Sapindus saponaria</i>	211	2	media	67,5
<i>Bursera graveolens</i>	104	1	media	68,3
<i>Cochlospermum vitifolium</i>	132	1	media	80,8
<i>Croton wagneri</i>	306	3	media	65,0
<i>Triplaris cumingiana</i>	509	5	media	71,7

PROM= Promedio, E/GR S= Esporas por cada 100 gramos de suelo, % MICO= Porcentaje de micorrización.

que Fernán Sánchez (*Triplaris cumingiana*) posee un mayor número de esporas por gramo de suelo.

## Referencias bibliográficas

1. Aguirre Mendoza, Z. H. (2012). Especies forestales de los bosques secos del Ecuador. Extraído de: <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/288/1/ZOFRE%20AGUIRRE%20MENDOZA.pdf>
2. Chauhan, H. E. M. L. A. T. A., Bagyaraj, D. J., Thilagar, G., & Ravi, J. E. (2012). Plant growth response of French bean to arbuscular mycorrhizal fungi. *J. Soil Biol. Ecol.*, 32, 50-56. Extraído de: [https://www.researchgate.net/profile/G\\_Thilagar/publication/275824326\\_Plant\\_Growth\\_Response\\_of\\_French\\_Be](https://www.researchgate.net/profile/G_Thilagar/publication/275824326_Plant_Growth_Response_of_French_Be)
3. Dieng, A., Duponnois, R., Ndoye, I., & Baudoin, E. (2015). Cultivation of *Jatropha curcas* L. leads to pronounced mycorrhizal community differences. *Soil Biology and Biochemistry*, 89, 1-11. Extraído de: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.06.019>
4. Gerderman, J.; Nicholson, T. (1963). Spores of mycorrhizal endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46:235-244. Extraído de: [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)
5. McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L., & Swan, J. A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. *New phytologist*, 115(3), 495-501. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x
6. Rojas-Mego, K. C., Elizarbe-Melgar, C., Gárate-Díaz, M. H., Ayala-Montejo, D., Pedro, R. C., & Sieverding, E. (2014). Hongos de Micorriza Arbuscular en tres Agroecosistemas de Cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Amazonía Peruana. *Folia Amazónica*, 23(2), 149-156. Extraído de: <http://revistas.iiap.org.pe/index.php/foviaamazonica/article/view/20/39>
7. Steel, R. G. D., & Torrie, J. H. (1980). Principles and procedures of statistic: a biometrical approach. New York: MacGraw-Hill. Extraído de: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=ACERVO.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mnfn=048114>.
8. Sieverding, E. (1983). Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo arbuscular en el laboratorio. Palmira, Valle, Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Extraído de: [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat\\_digital/CIAT/books/historical/198.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat_digital/CIAT/books/historical/198.pdf)
9. Wulandari, D., Cheng, W., & Tawaraya, K. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation improves *Albizia saman* and *Paraserianthes falcataria* growth in post-opencast coal mine field in East Kalimantan, Indonesia. *Forest Ecology and Management*, 376, 67-73. Extraído de: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.06.008>

**Recibido: 21 mayo 2017**

**Aprobado: 2 febrero 2018**

## RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

# Análisis morfológico y morfométrico de semillas de tres especies de orquídeas nativas de la región neotropical del Ecuador.

## Morphological and morphometric analysis of seeds of three species of native orchids from the neotropical region of Ecuador.

Vaca, I.<sup>1</sup>, Cueva, E. Moya, B., Acurio, R.<sup>1</sup>, Chiluisa-Utreras, V.<sup>1</sup>

DOI. 10.21931/RB/2018.03.01.8

527

**Resumen:** El presente estudio constituye el primer reporte que describe las características morfológicas y morfométricas de *Elleanthus capitatus*, *Epidendrum frutex* y *Odontoglossum hallii*, tres especies nativas del Ecuador. Se encontró que las especies *Epidendrum frutex* y *Odontoglossum hallii* son estadísticamente diferentes a *Elleanthus capitatus* en relación a la longitud y número de semillas por miligramo, ésta última resultó ser más pequeña. Los rangos de longitud encontrados variaron entre 0,231 mm (*Elleanthus capitatus*) hasta 0,702 mm (*Odontoglossum hallii*), mientras que el promedio del número de semillas por miligramo varió entre 702 (*Epidendrum frutex*) a 982 (*Elleanthus capitatus*) semillas/mg. Sin embargo, el diámetro de la semilla no presentó diferencia significativa entre especies, con un rango promedio de 0,06 a 0,08 mm. Además, se evaluó el color observado en las semillas, teniendo en cuenta el modelo de color RVA para su reporte. Las descripciones de las características de las semillas son de vital importancia con el fin de elucidar las relaciones taxonómicas, geográficas, filogenéticas y de conservación para la gran diversidad de orquídeas.

**Palabras clave:** *Elleanthus capitatus*, *Epidendrum frutex*, *Odontoglossum hallii*, orquídeas ecuatorianas

**Abstract:** The present research is the first report describing the morphological and morphometric characteristics of *Elleanthus capitatus*, *Epidendrum frutex* and *Odontoglossum hallii*, Ecuadorian three native species. It was found that species *Epidendrum frutex* and *Odontoglossum hallii* are statistically different from *Elleanthus capitatus* in relation to the length and number of seeds per milligram, the last one was found to be smaller. The seeds' length was 0.2131 mm (*Elleanthus capitatus*) to 0.702 mm (*Odontoglossum hallii*), while the average number of seeds per milligram from 702 (*Epidendrum frutex*) to 982 (*Elleanthus capitatus*) seeds/mg. However, the diameter of the seed showed no significant difference between species, with an average range of 0.06 to 0.08 mm. In addition, the color observed in the seeds was evaluated by RVA color model for its report. The description of the seeds are of vital importance in order to elucidate the taxonomic, geographic, phylogenetic and conservation relationships for the great diversity of orchids.

**Key words:** *Elleanthus capitatus*, *Epidendrum frutex*, *Odontoglossum hallii*, Ecuadorian Orchids.

### Introducción

La familia Orquidaceae es una de las más numerosas del Ecuador, actualmente es el primer país en número de especies, cuenta con 3549 especies y es muy probable que existan otras por descubrir<sup>1</sup>. En 2005 se publicó el "Opus Magnum de la orquideología neotropical", que describe 100 especies nuevas de orquídeas, de las cuales 52 son ecuatorianas<sup>2</sup>. De la población de orquídeas en el Ecuador, el 42% corresponde a especies endémicas (1710 especies), y la mayoría (1455 especies) presenta algún tipo de amenaza, de las cuales el 87% son vulnerables<sup>3</sup>.

En general las orquídeas crecen a diferentes alturas (0-4000 msnm), poseen hábitos muy variables y pueden ser libres o epífitas, su longitud puede variar desde centímetros hasta alcanzar los 3 m de altura, el tamaño de las flores varía desde milímetros hasta 15 cm, sus semillas son ultrafinas y no poseen tegumento alimenticio para su crecimiento por lo que para su germinación requieren realizar simbiosis con micorrizas<sup>4</sup>. De forma específica se han desarrollado diferentes estudios sobre la morfología en orquídeas en todo el mundo, Singer<sup>5</sup> escribió un artículo de reflexión sobre la morfología floral y polinización de las orquídeas basado en el segundo libro de Charles Darwin; Jiménez-Pérez<sup>6</sup>, recopilan en su es-

tudio titulado "Registros nuevos de orquídeas de los bosques montanos de Bolivia" una lista de géneros, especies y una breve descripción morfológica, distribución, entre otros. En el Ecuador, Pazmiño<sup>7</sup>, caracterizó de forma morfológica las semillas y su proceso germinativo en seis especies de orquídeas (*Ada andreettae*, *Cyrtochilum tricostatum*, *Epidendrum arachnoglossum*, *Helcia sanguinolenta*, *Prosthechea fragrans*, *Scuticaria salesiana*), amenazadas de Loja. Existen otros estudios realizados sobre orquídeas en el Ecuador respecto a cultivo de tejidos, conservación y más; sin embargo se encuentran escasamente descritas, en especial sobre la morfología de semillas<sup>7</sup>. Endara, León-Yáñez, & Norris<sup>8</sup> en su reporte sobre conservación de orquídeas de Ecuador, mencionan como prioridades taxonómicas y curacionales entre otros, a los géneros *Elleanthus*, *Odontoglossum* y *Epidendrum*.

La presente investigación describe la morfología de la semilla de tres especies de orquídeas (*Elleanthus capitatus*, *Epidendrum frutex* y *Odontoglossum hallii*), almacenadas en el Banco de germoplasma de Orquídeas del Ecuador Fase I – UPS, con el fin de facilitar su identificación y su conservación. Las tres especies están catalogadas como nativas del Ecuador, *Elleanthus capitatus* es una planta epífita herbácea que crece

<sup>1</sup> Grupo de Investigación BIOARN. Universidad Politécnica Salesiana. Quito-Ecuador.

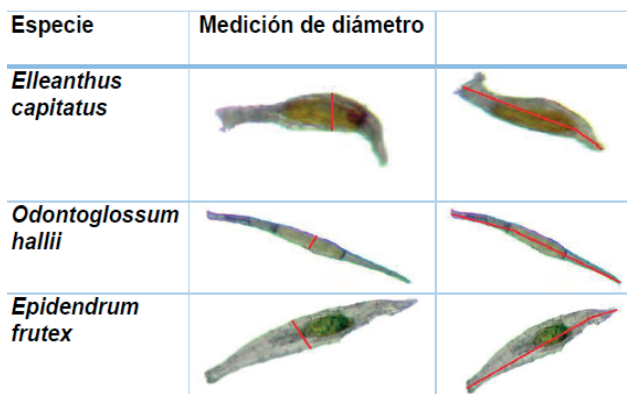
desde entre 0-3500 msnm, *Odontoglossum hallii* es también una planta epífita herbácea que se encuentra entre los 2000 y 3500 msnm; y, *Epidendrum frutex* es una planta herbácea, que se desarrolla desde los 2500 hasta los 3500 msnm<sup>9</sup>.

## Metodología

Las semillas de *Elleanthus capitatus*, *Epidendrum frutex* y *Odontoglossum hallii* fueron recolectadas en cápsulas para el Proyecto Banco de Germoplasma de la Universidad Politécnica Salesiana, y se colocaron en un desecador con silica gel por un período de 15 días con el fin de reducir la humedad para su mejor conservación.

Para determinar la morfología de las semillas de orquídeas se colocaron aleatoriamente 20 semillas de cada especie en un portaobjetos y se observó bajo el microscopio con el lente 40X. Mediante el programa MEASURE instalado en el microscopio, se midió en milímetros la longitud de las semillas desde el ápice hasta la base y el mayor diámetro de extremo a extremo. Todas las muestras fueron fotografiadas durante el proceso de medición (Figura 1).

**Figura 1.** Medición de longitud y diámetro de las semillas de las tres especies de orquídeas, vistas bajo el microscopio



Además, se pesó un miligramo de semillas sobre un portaobjetos, las cuales fueron cuantificadas bajo el microscopio, con la finalidad de determinar el número de semillas en un miligramo, en cada especie de orquídea. La forma de las semillas fue descrita y comparada con los gráficos publicados por Clifford & Smith<sup>10</sup> citado por Baskin & Baskin<sup>11</sup>, y Beer<sup>12</sup>.

Se evaluó el color del embrión en las semillas usando como referencia una escala colorimétrica, según ésta a cada color se le otorgó un código numérico. El color fue definido en función del modelo de color RVA (RGB en inglés), que está basado en la composición del color según intensidad de los colores primarios de la luz<sup>13</sup>; a continuación, se describe cada color, se le otorgó el número 1 (color verde), el número 2 (color verde olivo) y el número 3 (color verde claro) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Análisis de color en las semillas de orquídeas.

Denominación del Color	Nº	Color	Código RVA		
			Rojo	Verde	Azul
Verde	1		42	102	32
Verde olivo	2		142	151	21
Verde claro	3		212	219	123

## Resultados y discusión

Es necesario resaltar que la descripción que se realiza a continuación es uno de los primeros reportes, respecto a la morfología de las semillas de las especies *Elleanthus capitatus*, *Odontoglossum hallii* y *Epidendrum frutex*. Pocas investigaciones se han desarrollado, sobre descripción de semillas de orquídeas en Ecuador, debido a que las semillas son diminutas, por lo que el análisis de su estructura se dificulta<sup>14</sup>. Se han realizado estudios sobre la morfología y biología de las orquídeas en los géneros *Acanthophippium*, *Acropera*, *Aerides*, *Brassia*, *Calasetum*, *Cattleya*, *Laelia*, *Cynoches*, *Cyrtochilum*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Eulophia*, *Gongora*, *Leptotes*, *Maxillaria*, *Lycaste*, *Octomeria*, *Oncidium*, *Phajus*, *Promenaea*, *Stanhopea*, *Vanilla* y *Zygopetalum*<sup>12</sup>; de forma específica estudios de morfometría en semillas de orquídeas nativas de América del norte en los géneros *Cypripedium* y *Paphiopedilum*<sup>14</sup>, *Calypso*, *Cephalanthera*, *Corallorhiza* y *Epipactis*<sup>15</sup>, *Goodyera*, *Piperia*, *Platanthera* y *Spiranthes*<sup>16</sup>; también morfometría en semillas de 32 especies de orquídeas del Himalaya occidental pertenecientes a los géneros *Cypripedium*, *Goodyera*, *Spiranthes*, *Androcorys*, *Brachycorythis*, *Dactylorhiza*, *Dithrix*, *Habenaria*, *Herminium*, *Pecteilis*, *Peristylus*, *Platanthera*, *Satyrium*, *Epipactis*, *Gastrodia*, *Crepidium*, *Liparis*, *Oreorchis*, *Cymbidium*, *Eulophia*, *Eria*, *Gastrochilu* y *Rhynchostylis*<sup>16</sup>. Además, existen estudios específicos de diferentes géneros y especies de orquídeas propias de los Andes, sin embargo no describen la morfología de las semillas<sup>18, 19, 20</sup>.

Para las semillas de las especies *Elleanthus capitatus*, *Odontoglossum hallii* y *Epidendrum frutex*, se realizó un análisis de los valores obtenidos para las variables longitud y diámetro de las semillas y número de semillas por miligramo, se encontró que existió diferencia significativa para la longitud y el peso entre las especies ( $p < 0,0001$ ) con un coeficiente de variación de 8,37 y 11,47 respectivamente (Tabla 2).

**Tabla 2.** Promedio ( $\pm$ ) el error estándar de longitud y diámetro de las semillas y número de semillas por miligramo para las tres especies de orquídeas.

\*Diferencia significativa. Diferentes letras presentan diferencia significativa.

Especie	Longitud (mm) *	Diámetro (mm)	Semillas/mg *
<i>Elleanthus capitatus</i>	0,28 $\pm$ 0,01 a	0,06 $\pm$ 0,01 a	982,5 $\pm$ 18,72 a
<i>Odontoglossum hallii</i>	0,60 $\pm$ 0,01 b	0,08 $\pm$ 0,01a	739,7 $\pm$ 18,72 b
<i>Epidendrum frutex</i>	0,56 $\pm$ 0,01 b	0,07 $\pm$ 0,01a	702,75 $\pm$ 18,72b

En la evaluación de las semillas de *Odontoglossum hallii* y *Epidendrum frutex* se encontró que fueron similares según las variables longitud, diámetro y peso; mientras que, las semillas de *Elleanthus capitatus* presentaron un tamaño menor y fueron significativamente diferentes en longitud y peso; sin embargo, se observa también, que no existió diferencia significativa en el diámetro de las tres especies. Al comparar los promedios de las variables se evidencian amplios rangos en longitud, que varió desde 0,28 a 0,60 mm y en número de semillas por miligramo, desde 702,75 a 982,5 (Tabla 2). Lo observado concuerda con Baskin & Baskin<sup>11</sup>, pues como se puede apreciar el tamaño de las semillas en general es minúsculo, una característica que todas las orquídeas comparten; sin embargo se observa también la diferencia en longitud y peso entre las especies,

tal como se esperaba ya que existe mucha variación entre las orquídeas respecto al tamaño, colores, estructura, forma de la semilla, entre otros (Arditti et al., 1979). El peso de las semillas de las tres especies varió entre 1 a 1,42 ug. Baskin & Baskin<sup>11</sup>, indican que el rango de peso puede variar entre 0,3 y 14 ug dependiendo de la especie, y esto se debe a la falta del endospermo.

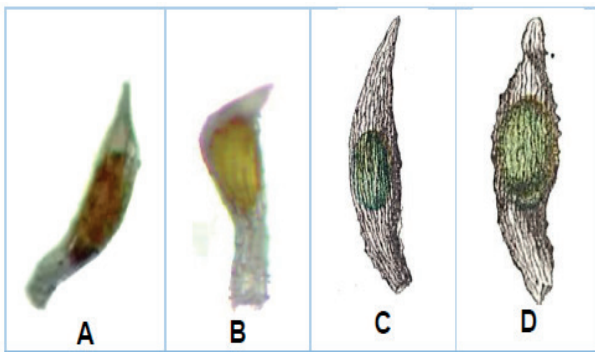
### Elleanthus capitatus

*Elleanthus capitatus* (Poepp. & Endl.) Rchb. f., es aceptada también como *Elleanthus cynarocephalus* (Rchb. f.) Rchb. f. y *Evelyna capitata* Poepp. & Endl.; además, es conocida con los siguientes sinónimos *Bletia capitata* R. Br., *Elleanthus casapensis* (Rchb. f.) Rchb. f., *Elleanthus cephalophorus* (Rchb. f.) Rchb. f., *Elleanthus zamorensis* Garay, *Evelyna capitata* Poepp. & Endl., *Evelyna casapensis* Rchb. f. y *Evelyna cephalophora* Rchb. f.<sup>9</sup>

Para *Elleanthus capitatus* la semilla presentó una longitud desde 0,231 a 0,362 mm, resultando un promedio de 0,28 mm, la medición del diámetro varió entre 0,054 a 0,079 mm con un promedio de 0,06 mm. La semilla de esta especie es la que presentó el menor peso individual, con un peso aproximado de 1,017 ug, obtenido del promedio del total de semillas contabilizadas en un miligramo (982,5 semillas/mg).

La semilla es alargada, su largo en 4,7 veces su diámetro, la forma es ensanchada en el centro con un extremo puntiagudo y el otro extremo cuadrado, esta forma fue comparada con las figuras número 37 (*Epidendrum cochleatum*) y 46 (*Epidendrum lancifolium*) del gráfico de formas de semillas tomado de Beer<sup>12</sup>, de la tabla III de ilustraciones (Figura 2). La variable de color vista bajo el microscopio obtuvo un promedio de color de 1,8 lo que significa que su color predominante es verde olivo (Tabla 1).

**Figura 2.** Semillas de *Elleanthus capitatus*. A y B: fotografías de *Elleanthus capitatus*. C y D: Figuras del gráfico de formas de semillas tomado de tabla III de ilustraciones de Beer<sup>12</sup>.



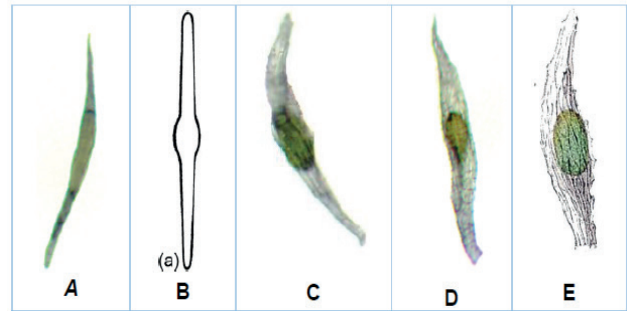
### Odontoglossum hallii

Esta especie tiene como sinónimo *Oncidium hallii*<sup>9</sup>. Respecto a la longitud de la semilla de *Odontoglossum hallii*, se encontró un promedio de 0,6 mm obtenido de semillas cuya longitud varió entre 0,536 y 0,702 mm. El diámetro se encontró en un rango de 0,075 a 0,124 mm, obteniéndose un promedio de 0,08 mm. En un miligramo de semilla de *Odontoglossum hallii* se cuantificaron en promedio 739,7 semillas, concluyendo que el peso individual promedio de una semilla es de 1,35 ug.

El largo de la semilla es 7,5 veces su diámetro, su forma es engrosada en el centro y ambos extremos terminan en una punta fina (Figura 3), por lo que se le comparó con una de las cinco formas básicas pertenecientes a las tribus Epidendreae

y Neottieae descritas por Clifford & Smith<sup>10</sup> citados por Baskin & Baskin<sup>11</sup>. La semilla observada bajo el microscopio presentó un promedio de color 3, indicando un color verde claro (Tabla 1).

**Figura 3.** Semillas de *Odontoglossum hallii* y *Epidendrum frutex*. A: fotografía de *Odontoglossum hallii*. B: Figura básica por Clifford & Smith<sup>10</sup>. C y D: fotografías de *Epidendrum frutex*. E: Figura número 21 del gráfico de formas de semillas tomado de tabla IV de ilustraciones Beer<sup>12</sup>.



### Epidendrum frutex

Conocida también por su sinónimo *Epidendrum orthocaulis*<sup>9</sup>. Las semillas de *Epidendrum frutex* presentaron una longitud variable entre 0,421 a 0,670 mm, resultando un promedio de 0,56 mm; mientras que el diámetro presentó medidas entre 0,046 a 0,095 mm, dando como promedio 0,07 mm, similar a *Odontoglossum hallii*. El peso individual de la semilla obtenido del promedio de semillas en un miligramo (702,75), fue de 1,42 ug. Se hace evidente la gran diversidad existente en orquídeas, al comparar la longitud máxima encontrada en las semillas de *Epidendrum frutex* (0,67 mm) con una orquídea híbrida perteneciente al género *Epidendrum* cuya longitud alcanza hasta 3,85 mm en la semilla<sup>10,11</sup> siendo esta última casi seis veces la longitud de *Epidendrum frutex*.

La forma de las semillas es alargada y ensanchada en el centro, su forma fue cotejada con las figuras básicas desarrolladas por Clifford & Smith<sup>10</sup> y con la figura número 21 del gráfico de formas de semillas tomado de la tabla IV de ilustraciones de Beer<sup>12</sup>. La semilla de *Epidendrum frutex* es similar a la semilla de *Epidendrum ciliare* conforme a las ilustraciones<sup>12</sup> debido a que las semillas de ambas especies son largas con una terminación puntiaguda y otra cuadrada (Figura 3). El color percibido bajo el microscopio fue verde; evaluado con un promedio de 1, obtenido durante las observaciones (Tabla 1).

### Conclusiones

Al realizar la descripción morfológica y morfométrica de las semillas de tres especies de orquídeas del Ecuador, mediante la descripción de su forma, peso, longitud, diámetro y color, se encontró diferencia significativa entre las especies, resultando *Elleanthus capitatus* diferente a *Epidendrum frutex* y *Odontoglossum hallii*, en las variables longitud y peso de la semilla.

*Elleanthus capitatus* es la especie que menor longitud y diámetro promedio de semilla presentó con 0,28 mm y 0,06 mm respectivamente, el peso promedio de la semilla fue de 1,017 ug. Mientras que las semillas de *Epidendrum frutex* presentaron una longitud y diámetro promedio de 0,56 mm y 0,07 mm respectivamente, su peso promedio fue 1,42 ug. *Odontoglossum hallii* presentó mayor longitud y diámetro promedio de semilla, con 0,6 mm y 0,08 mm respectivamente,



y su peso fue de 1,35 ug.

### Agradecimientos

Se agradece al Ministerio del Ambiente del Ecuador (MAE) por la Autorización de investigación científica N° 08-2013-0869-IC\_FAU-FLO-DAPI-UNO-MAE emitida para la ejecución del proyecto "Banco de germoplasma de Orquídeas del Ecuador Fase I (sección Cotacachi-Cayapas)" otorgado al Doctor Marco Fernando Cerna Cevallos, y a la Universidad Politécnica Salesiana por destinar fondos para el mencionado proyecto.

### Referencias bibliográficas

1. Diazgranados, M., Hernández, D., Tobar, L., & Sánchez, P. (2015). ORQUÍDEAS: SEXO, PASIÓN E INVESTIGACIÓN 48. *Revista Innovación y Ciencia*, 22(1-2015). Recuperado a partir de [https://www.researchgate.net/profile/Mauricio\\_Diazgranados/publication/302364263\\_Orquideassexo\\_pasion\\_e\\_i](https://www.researchgate.net/profile/Mauricio_Diazgranados/publication/302364263_Orquideassexo_pasion_e_i).
2. Morales, C. O. (2005). SOBRE UN OPUS MAGNUM DE LA ORQUIDEOLOGÍA NEOTROPICAL: HÁGSATER, E. & SÁNCHEZ SALDAÑA, L. (EDS.). 2004. ICONES ORCHIDACEARUM, FASC. 7, THE GENUS EPIDENDRUM, PART 4. "A FOURTH CENTURY OF NEW SPECIES IN EPIDENDRUM". *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 5(1). Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44339807011>
3. Endara, L., León Yáñez, S., & Norris, W. (2008). Panorama de conservación de orquídeas en la región andina: EL caso de estudio de las orquídeas amenazadas no Brasil., Jardín Botánico de Río de Janeiro, Brasil. Recuperado a partir de [https://www.flmnh.ufl.edu/ecuadororchids/Cores\\_Brasil.pdf](https://www.flmnh.ufl.edu/ecuadororchids/Cores_Brasil.pdf)
4. Patzelt, E. (1996). FLORA DEL ECUADOR. Recuperado a partir de <http://patzelt-ecuador.de/html/flora1.html>
5. Singer, R. (2009). MORFOLOGÍA FLORAL Y POLINIZACIÓN DE ORQUÍDEAS: EL SEGUNDO LIBRO DE CHARLES DARWIN. Recuperado a partir de <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v14s1/v14n4a21.pdf>
6. Jiménez-Pérez, I. (2011). Registros nuevos de orquídeas de los bosques montanos de Bolivia. Parte I. *Ecología en Bolivia*, 46, 57-61.
7. Pazmiño, R. (2011). Caracterización morfológica de semillas y del proceso germinativo de seis especies de orquídeas amenazadas en la provincia de Loja para la conservación en el banco de germoplasma de la UTPL. Recuperado a partir de <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/1921>
8. Endara, L., León Yáñez, S., & Norris, W. (2007). Patrones de endemismo de orquídeas ecuatorianas: Perspectivas y prioridades para la conservación. Presentado en Second Scientific Andean Orchid Conference, Loja, Ecuador. Recuperado a partir de [https://www.flmnh.ufl.edu/ecuadororchids/Andean\\_Conference\\_Loja.pdf](https://www.flmnh.ufl.edu/ecuadororchids/Andean_Conference_Loja.pdf)
9. Tropicos.org. (2017, c). Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. Recuperado el 18 de abril de 2017, a partir de <http://www.tropicos.org/Project/CE>
10. Clifford, H., & Smith, W. (1969). Seed morphology and classification of Orchidaceae. *Phytomorphology*, 19, 133-139.
11. Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2001). *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Elsevier.
12. Beer, J. G. (1863). Beiträge zur morphologie und biologie der familie der orchideen. Von J. G. Beer. Wien : C. Gerold's Sohn., Recuperado a partir de <http://www.biodiversitylibrary.org/item/91634>
13. Delgado, J. M. (2002). Photoshop 7. España. Recuperado a partir de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=318316>
14. Arditti, J., Michaud, J. D., & Healey, P. L. (1979). Morphometry of Orchid Seeds. I. Paphiopedilum and Native California and Related Species of Cypripedium. *American Journal of Botany*, 66(10), 1128-1137. <https://doi.org/10.2307/2442211>
15. Arditti, J., Michaud, J. D., & Healey, P. L. (1980). Morphometry of Orchid Seeds. II. Native California and Related Species of Calypso, Cephalanthera, Corallorhiza and Epipactis. *American Journal of Botany*, 67(3), 347-360. <https://doi.org/10.2307/2442345>
16. Healey, P. L., Michaud, J. D., & Arditti, J. (1980). Morphometry of Orchid Seeds. III. Native California and Related Species of Goodyera, Piperia, Platanthera and Spiranthes. *American Journal of Botany*, 67(4), 508-518. <https://doi.org/10.2307/2442290>
17. Verma, J., Sharma, K., Thakur, K., Sembi, J. K., & Vij, S. P. (2014). Study on seed morphometry of some threatened Western Himalayan orchids. *TURKISH JOURNAL OF BOTANY*, 38(2), 234-251.
18. Hágsater, E. (2004). The Genus Epidendrum: Part 4 "A Fourth Century of New Species in Epidendrum"; *Icones Orchidacearum*. Recuperado a partir de [http://www.academia.edu/5825934/The\\_Genus\\_Epidendrum\\_Part\\_4\\_A\\_Fourth\\_Century\\_of\\_New\\_Species\\_in\\_Epidendrum](http://www.academia.edu/5825934/The_Genus_Epidendrum_Part_4_A_Fourth_Century_of_New_Species_in_Epidendrum)
19. Meisel, J. E., & Woodward, C. L. (2005). Andean Orchid Conservation and the Role of Private Lands: A Case Study from Ecuador. *Selbyana*, 26(1/2), 49-57.
20. Kolanowska, M., & Mystkowska, K. (2014). A new species of Epidendrum (Orchidaceae) from Panama. *Polish Botanical Journal*, 59(2), 181-183.

Recibido: 1 septiembre 2017

Aprobado: 20 diciembre 2017

## RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

# Evaluación de los Hongos Micorrízicos Arbusculares de zonas del trópico húmedo del Ecuador

## Evaluation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi from humid tropical areas of Ecuador

Emy Moína-Quim<sup>1</sup>, Rodrigo Oviedo-Anchundia<sup>1</sup>, Shaylor Nieto-Barcelona<sup>2</sup>, Paúl Herrera-Samaniego<sup>1</sup>, Milton Barcos-Arias<sup>1</sup>.

DOI. 10.21931/RB/2018.03.01.9

531

**Resumen:** El estudio se enfocó en el análisis de la simbiosis entre hongos micorrízicos arbusculares y árboles del trópico húmedo ecuatoriano, mediante técnicas físicas de separación se aisló esporas de hongos micorrízicos arbusculares para obtener la densidad por gramos de suelo, mientras que el porcentaje de micorrización en la flora representativa fue determinada al comprobar la presencia de estructuras micorrízicas en el interior de las raíces de las plantas evaluadas, y además, se realizó un análisis físico-químico del suelo estudiado. Los análisis arrojaron resultados que demuestran una densidad media de esporas, también se determinó un porcentaje de micorrización por arriba del 50% en las floras representativas. A nivel de esporas, se identificaron géneros predominantes de las zonas, estando presentes *Acaulospora*, *Ambispora*, *Claroideoglossum*, *Diversispora*, *Entrophospora*, *Funneliformis*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Pacispora* y *Scutellospora*, de los cuales se llegó a identificar por métodos taxonómicos cerca de 15 especies. Concluyendo que existe una diversidad de hongos micorrízicos arbusculares en el trópico húmedo ecuatoriano.

**Palabras clave:** Simbiosis, micorrización, condiciones abióticas, hospedador, hongos, trópico húmedo ecuatoriano.

**Abstract:** The study approached the symbiotic analysis among Arbuscular Mycorrhizal Fungi and trees of Ecuadorian humid tropics, through physical separation techniques spores were isolated to determinate the Arbuscular Mycorrhizal Fungi density per soils gram, also the mycorrhization percentage of representative flora was determined by the presence of Mycorrhizal structures inside the evaluated plants roots, additionally, it was performed a physical-chemistry analysis of soil. The different analyzes showed an average density of spores, a mycorrhization percentage over 50 % in the representative flora. The predominant genera of spores were taxonomically identified as *Acaulospora*, *Ambispora*, *Claroideoglossum*, *Diversispora*, *Entrophospora*, *Funneliformis*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Pacispora* and *Scutellospora*, there has been about 15 species in selected zones. Concluding that there is a great diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the ecuadorian humid tropics.

**Key words:** Symbiosis, micorrization, abiotic conditions, host, fungi, ecuadorian humid tropics.

### Introducción

La rizósfera es el ambiente donde ocurren las principales interacciones entre los microorganismos y las plantas. Gran parte de estas interacciones afectan al desarrollo, productividad y funciones esenciales de la flora circundante. Además, en este nivel se produce la descomposición de la materia orgánica con la colaboración de los microorganismos presentes en la rizósfera, que a su vez desencadena en la liberación de los nutrientes al suelo<sup>1</sup>. Otros microorganismos rizosféricos se encargan de la captación de los nutrientes liberados, es en este grupo donde encontramos a los hongos micorrízicos arbusculares (HMA).

Los HMA son simbiontes obligados que colonizan, o micorrizan, aproximadamente el 74% de plantas terrestres<sup>2</sup>, rasgo característico que les permite adaptarse en diferentes ambientes, llegando a comprender del 5 al 50% de la biomasa microbiana total del suelo<sup>3</sup>. La relación simbiótica entre planta y hongo les otorga grandes beneficios a ambas partes involucradas. Las plantas generan las principales fuentes del carbono necesario para el desarrollo y la multiplicación de los HMA. Por otra parte, los HMA confieren a las plantas hospedadoras una mejor absorción y toma de nutrientes, así como la capta-

ción de iones inmóviles de fósforo. Adicionalmente, la interacción con los HMA les otorga mayor resistencia a los diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, y aumenta la productividad y el desarrollo radicular de la planta gracias a la formación de microagregados del suelo<sup>4</sup>.

Si bien los HMA no tienen especificidad por colonizar una especie de planta en particular, esto no significa que haya un grado de compatibilidad idéntico entre todas las interacciones de especies de HMA y las plantas terrestres. Se ha comprobado que la compatibilidad de la interacción simbiótica entre plantas y HMA es mayor entre unos géneros que entre otros, y esta peculiaridad puede ser aprovechada en muchos ámbitos<sup>5</sup>. Los países desarrollados han creado tecnologías y productos a base de micorrizas, sin embargo, esta interacción no ha sido estudiada en su totalidad.

En Ecuador, el desarrollo biotecnológico utilizando HMA ha ido acrecentándose, sin embargo, cabe mencionar la poca información existente respecto a la identificación de los principales géneros de HMA presentes en los bosques ecuatorianos, siendo esta información necesaria para la aplicación y elaboración de productos a base de HMA. Así mismo sería importante

<sup>1</sup> 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, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador.

<sup>2</sup> Fundación Privada Ecuatoriana, Ave. Fco. De Orellana Ma111 Edif. Wordl Trade Center Torres B Piso 3 oficina 319, Guayas, Ecuador.

conocer el número más probable de propágulos micorrizales infectivos<sup>6</sup>. Respecto a esta problemática, este estudio quiere dar a conocer los géneros predominantes de estos hongos y las condiciones a las cuales están expuestos naturalmente en bosques del trópico húmedo, teniendo en cuenta que son uno de los sectores que posee mayor diversidad biológica en el país<sup>7</sup>.

## Materiales y métodos

La evaluación de los HMA fue realizada en los cantones Pallatanga, Bucay y La Maná, estos tres sitios poseen una vegetación y condiciones climáticas similares, presentando variabilidad en sus climas desde cálido, templado y hasta frío, con precipitaciones variable entre 1000-3000 mm según la época del año, lo cual es propio del trópico húmedo ecuatorial<sup>8,9</sup>. En estos cantones se seleccionaron sectores específicos para hacer muestreos en la temporada de invierno, recolectando muestras de suelo rizosférico y raíces de plantas principalmente de banano (*Musa spp.*), cacao (*Theobroma cacao*), y de especies forestales como el niguito (*Muntingia calabura*). Las coordenadas de referencia tomadas en los sectores A1- A2 de Pallatanga fueron 02°09'26.0" S y 079°03'45.2" W, en los sectores B1 – B2 en Bucay fueron 02°11'59.2" S y 079°07'06.8" W, y en los sectores C1 – C2 en La Maná fueron 00°56'32.0" S y 079°14'16.5" W. El suelo rizosférico y las raíces fueron aprovechados para determinar el porcentaje de micorrización, la densidad de esporas por gramos de suelo, e identificar los principales géneros de esporas HMA de la zona. Además, con estas muestras se determinaron el análisis físico-químico de los suelos.

### Análisis físico-químico de los suelos

El análisis físico-químico de las muestras fue realizado en el departamento de suelo del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Por cada muestra se envió 1 Kg de suelo correspondiente a cada sector seleccionado, y se determinó la textura y la humedad del suelo, la materia orgánica por el método de Walkley-Black, fósforo total, amonio y potasio mediante Olsen modificado pH 8.5, el pH en suspensión suelo: agua 1:2.5, y la conductividad eléctrica en pasta saturada.

### Aislamiento, determinación de densidad e identificación de los hongos micorrizicos arbusculares

La técnica empleada para el aislamiento de esporas, corresponde a la metodología de tamizado en húmedo y decantación<sup>10</sup>, continuando con la extracción por gradientes de densidad<sup>11</sup>. El sobrenadante final fue disuelto en agua para lavar parcialmente a las esporas, y el criterio para determinar la densidad de esporas HMA fue el siguiente criterio: densidad baja corresponde < 1 esporas/g de suelo; densidad media corresponde 1 – 10 esporas/g de suelo; y densidad alta corresponde > 10 esporas/g de suelo<sup>12</sup>.

Posterior al proceso de aislamiento de esporas, éstas fueron fijadas en placas portaobjetos para su conservación y posterior identificación. La técnica de fijación consistía en el uso de PVLG (Alcohol polivinílico-ácido láctico-glicerol) y reactivo de Melzer<sup>13</sup>. Además, se tomó en cuenta durante el montaje de esporas, que el uso de PVLG + reactivo de Melzer sería empleado para esporas en mal estado, mientras que el PVLG sería aplicado para esporas en buen estado. Aproximadamente, 15 esporas fueron colocadas por placa.

### Determinación del porcentaje de micorrización en raíces

Se tomaron 10 individuos de las especies agroforestales predominantes como banano, cacao y niguito por cada sector, de estos fueron extraídas las raíces que se encontraban a una profundidad de 5 - 20 cm. El análisis consistió en comprobar la presencia de estructuras micorrizicas (hifas, vesículas y arbusculos) dentro de las raíces. Las muestras pasaron por los procesos de clarificación y tinción<sup>14</sup>, luego se colocó 10 raíces de 1,5 cm de longitud en placas porta objetos.

Las raíces fueron analizadas bajo el lente 20X de un microscopio óptico compuesto, dividiendo a las raíces en tres campos ópticos observables, y a cada campo se lo diagnosticó como positivo si se observaba al menos una de las tres estructuras micorrizicas. La fórmula utilizada para determinar el porcentaje aproximado de micorrización fue:

$$\% \text{ de micorrización} = \frac{\# \text{ campos con (Hifas, Arbusculo, Vesículas)} * 100}{\# \text{ total de campos observados}}$$

la misma que fue establecida por McGonigle<sup>15</sup>.

### Identificación morfológica de las esporas de hongos micorrizicos arbusculares

La identificación de los géneros predominantes de HMA se basó en las características morfológicas de las esporas, principalmente en el color, la textura, el tamaño, el número de paredes y capas que recubren a la espora, la cantidad de cicatrices presentes, y la unión de la hifa suspensoria a la espora. Las características fueron examinadas empleando manuales morfológicos de libre acceso, dos de ellos son manuales en línea, uno propuesto por INVAM de la Universidad de Virginia<sup>16</sup>, otro manual de libre acceso fue propuesto en la página web de Blaszkowski<sup>17</sup>, y el tercer manual corresponde al anexo de una tesis doctoral que empleó la recopilación de claves taxonómicas y artículos científicos para la determinación de especies HMA<sup>18</sup>.

## Resultados y discusión

### Caracterización físico-químico del suelo

De acuerdo a los resultados expuestos en la tabla 1, el tipo de textura que presentan los suelos colectados es franco-arenoso, el pH varía según el sector encontrándose desde 6,8 hasta 5, que corresponden a pH neutro y fuertemente ácido respectivamente, según la norma NOM-021-RECNAT-2000<sup>19</sup>, siendo a su vez el factor pH de gran relevancia para la adaptación de los HMA, prefiriendo pH neutros, aunque pueden llegar a desarrollarse hasta en pH ácidos<sup>20</sup>. Mientras que la conductividad eléctrica los valores oscilaron entre 0.23 y 1,10 mS/cm que corresponden a niveles bajo en salinidad, estas concentraciones no afectan a la micorrización ya que está demostrado que en suelos salinos puede progresar la simbiosis<sup>21, 22</sup>. En lo que respecta a los niveles de P también variaron según el sector encontrándose entre 11,0 a 30,0 µg/ml considerados como nivel medio según reporte del análisis. La simbiosis entre HMA y las plantas se inhibe cuando los niveles de P son altos<sup>5</sup>, los niveles bajos y medios de P favorecen la relación simbiótica de HMA y planta<sup>23</sup>.

Otros parámetros tomados en cuenta fueron el nivel de nitrógeno (N), la humedad del suelo y el porcentaje de materia orgánica (MO), con el fin de conocer si éstos influyen en la micorrización de las plantas en los sectores seleccionados. Estudios realizados por Martínez y Pugnaire<sup>24</sup> mencionan que la relación entre N y HMA tiene mayor incidencia en la mico-

rización que la relación de ésta frente al P, esta afirmación se apoya por estudios que han comprobado que el nivel de N es inversamente proporcional a la micorrización en plantas, mientras menor sean los niveles de N, mayor sería micorrización por HMA<sup>25, 26</sup>. En base a la información citada, los niveles de N reportados en la tabla 1 no afectarían a la simbiosis de HMA en las zonas analizadas. Respecto a la humedad y el porcentaje de MO, la humedad en el suelo no sobrepasa el 52%, y en MO varió entre 3% y 10%. También, ha sido reportado que la adaptación de los HMA es más favorable en suelos húmedo, que en suelos inundado o secos<sup>27</sup>, sin embargo otros estudios realizados en bosques del trópico húmedo, muestran que la humedad del suelo como factor ambiental, influye muy poco en la frecuencia de la micorrización<sup>28</sup>. Con relación al porcentaje de MO, un estudio realizado en el caribe colombiano, la MO y su descomposición afecta directamente a los niveles de pH

de pH, humedad, materia orgánica y nutrientes a los que están expuestos.

#### Determinación del porcentaje de colonización en las raíces de la flora representativa.

Los resultados descritos en la figura 1, corresponde al análisis efectuado a raíces de la flora representativa en cada sector de estudio. Al colocar 10 raíces por placa, dio como resultado un mínimo de 30 campos observables, en ellos figuraron las estructuras hifas, vesículas y arbuscúlos. En la figura 2 están representadas las estructuras propias de los HMA y en la figura 1 queda expuesto, que los sectores con mayor porcentaje de colonización en sus raíces, corresponden a A1 y C1, ubicado en los cantones Pallatanga y La Maná respectivamente. Los valores mínimos de colonización corresponden a los sectores A2 y B2, lugares que han estado expuestos en

**Tabla 1.** Análisis físico-químico de las diferentes muestras de suelo colectadas en sectores del trópico húmedo. "FA" hace referencia a la textura FRANCO-ARENOSA del suelo

SECTOR	Parámetros Físicos y Químicos										
	Textura (%)			Clase Textural	H (%)	MO (%)	pH	mS/cm C.E.	Ppm		
	Arena	Limo	Arcilla						P	NH4	K
A1	63,0	24,0	13,0	FA	41,1	3,0	6,8	0,8	13,0	28,0	311,0
A2	63,0	24,0	13,0	FA	41,1	3,0	6,8	0,8	13,0	28,0	311,0
B1	49,0	36,0	15,0	FA	31,1	4,1	5,2	0,4	30,0	32,0	251,0
B2	41,0	38,0	21,0	FA	40,4	3,3	5,9	0,6	20,0	30,0	368,0
C1	57,0	32,0	11,0	FA	37,5	7,7	5,6	0,2	11,0	36,0	153,0
C2	65,0	24,0	11,0	FA	52,6	10,3	5,0	1,1	12,0	16,0	147,0

en el suelo, y como ya fue mencionado el pH tiene un efecto en la micorrización<sup>29</sup>.

#### Cuantificación de la densidad de esporas HMA en suelo rizosférico.

La densidad de esporas HMA nativas puede estar influenciada principalmente por aspectos ambientales<sup>18, 30</sup>. Los resultados exhibidos en la tabla 2, muestran la cantidad de esporas por gramos de suelo correspondiente a los diferentes sectores seleccionados. Los resultados revelan un promedio de densidad media que oscila entre 1,4 esporas/gramo de suelo y 3,4 esporas/gramo de suelo. Las muestras que presentan mayor densidad corresponden al sector C2 ubicado en el cantón La Maná, y las muestras con menor densidad corresponden al sector B2 ubicado en el cantón Bucay. En todos los sectores estudiados, la densidad de esporas por gramos de suelo es media. Se prevé que la tenue diferencia de densidad de esporas exhibidas entre los cantones, es dada por los distintos niveles

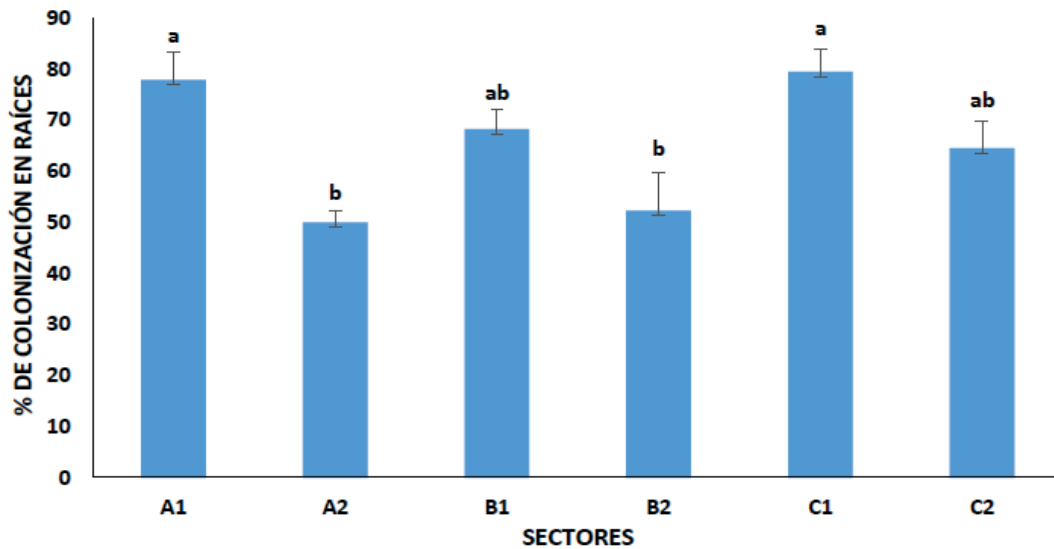
baja medida, a intervenciones antropogénicas por parte de los habitantes del sector. Aun así, se considera a la flora representativa como micorrizada, debido a que el porcentaje de colonización está por encima del 50%.

Bago<sup>31</sup>, menciona la diferencia entre efectividad e infectividad en una planta, mostrando que una planta con un alto nivel de porcentaje micorrización puede tener efectos poco notables, mientras que la misma planta micorrizada por otras especies de HMA aún con niveles más bajos de micorrización, pueden presentar mayor efecto positivo en la misma. Por otra parte, el porcentaje de micorrización o colonización en las raíces muestreadas no está relacionado específicamente con la densidad de esporas HMA, este comportamiento también fue observado en un estudio dado en la Amazonía Colombiana<sup>32</sup>, donde el comportamiento de micorrización podría ser mayor en una especie que en otra, sin embargo el número de esporas podría ser no muy alto en dicho tratamiento.

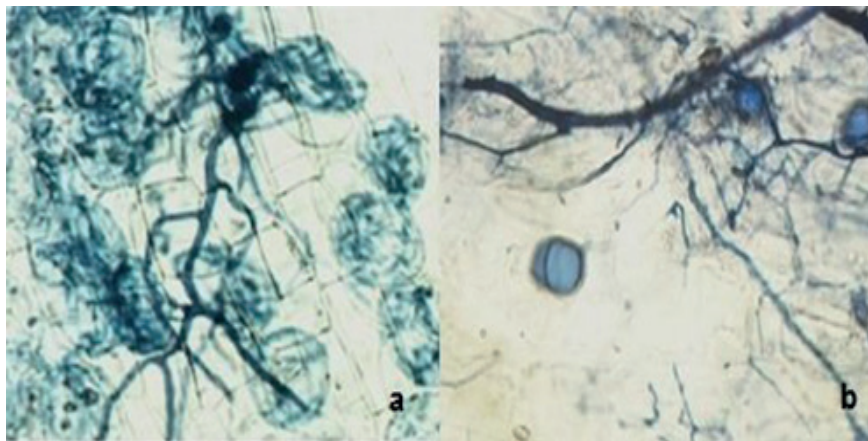
**Tabla 2.** Densidad de esporas en suelo rizosférico. Donde (M) corresponden al número de réplica y (PROM), al promedio de las tres réplicas, y E/G.S es la relación de esporas por g de suelo.

SECTOR	M 1	M 2	M 3	PROM	E /g.S	Densidad
A1	149	158	149	152 <sup>±</sup> 5,2	1,5	Media
A2	157	178	155	163 <sup>±</sup> 12,7	1,6	Media
B1	139	150	138	142 <sup>±</sup> 6,7	1,4	Media
B2	136	142	140	139 <sup>±</sup> 3,1	1,4	Media
C1	167	142	143	151 <sup>±</sup> 14,2	1,5	Media
C2	302	325	383	337 <sup>±</sup> 41,7	3,4	Media

**Figura 1.** Porcentaje de micorrización en raíces de la flora representativa correspondiente a los sectores seleccionados. Diferentes letras en las columnas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ )  $n=8$ .



**Figura 2.** Micorrización en raíces. a) Colonización por hifas y arbusculos; b) Colonización por hifas y vesículas.



#### Identificación de los principales géneros de HMA en las zonas del trópico húmedo.

Algunos géneros de HMA fueron hallados en los lugares evaluados en el trópico húmedo ecuatoriano, alrededor de 15 especies fueron encontradas en los principales géneros como se muestra en la figura 3. Los géneros encontrados en mayor abundancia corresponden a *Acaulospora*, *Ambispora*, *Claroideoglossum*, *Diversispora*, *Funneliformis*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Pacispora*, y *Scutellospora*. Varias especies de HMA que antes fueron definidas como *Entrophospora*, han sido ubicadas recientemente en el género *Acaulospora*, dejando solo una especie en *Entrophospora*<sup>16</sup>, denominada *Entrophospora infrequens*<sup>33</sup> y ésta fue hallada en el presente estudio.

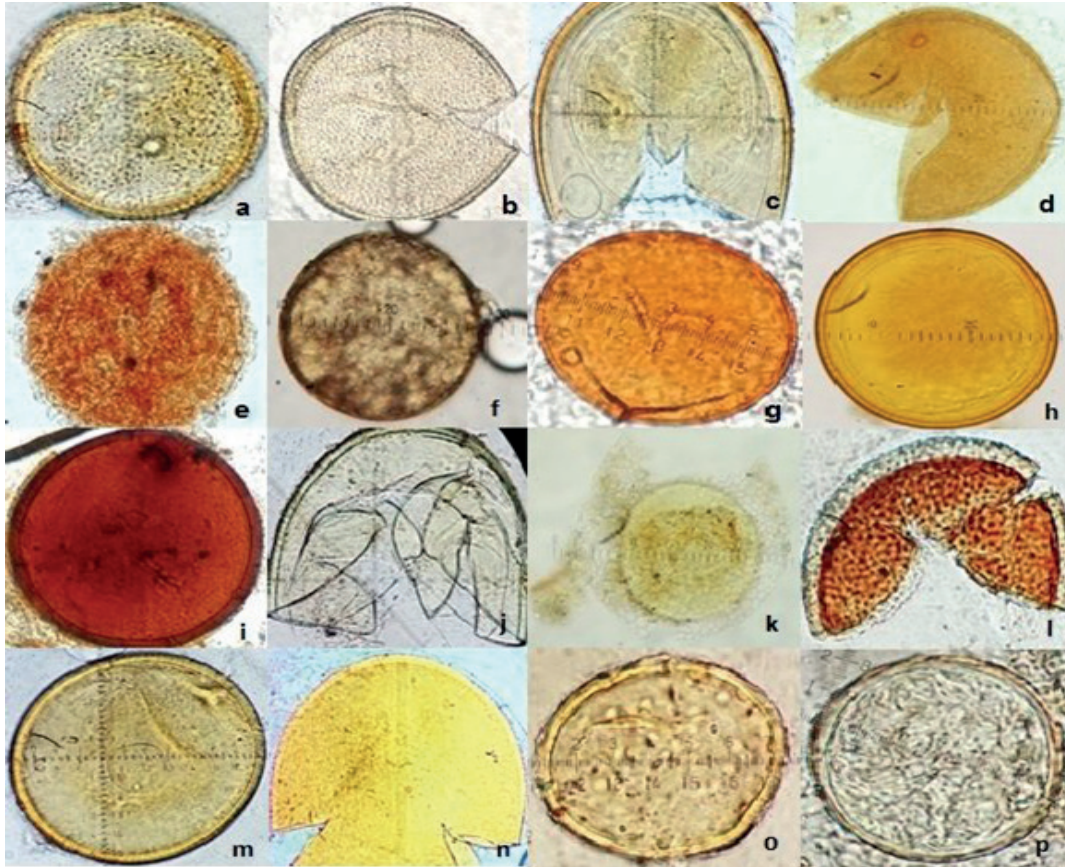
El género *Acaulospora* fue identificado debido a las cicatrices presentadas en la superficie de la espora, característica propia de su género al desprenderse la espora de la hifa suspensoria, además, en su gran mayoría poseen una superficie ornamentada, aunque hay especies las cuales poseen una superficie lisa<sup>18</sup>. Las *Ambisporas* poseen como característica principal, el desarrollo de dimórfico de esporas glomoides y acaulosporoides<sup>34</sup>, se presume que las especies de *Ambispora* encontradas son acaulosporoides, ya que presentan características muy similares con las *Acaulosporas*. Del género *Claroideoglossum*, se logró identificar una de las especies de HMA debido a la inminente presencia de una capa evanescente en el

exterior de la espora, y en el interior una pared semiflexible<sup>35</sup>.

Las esporas de los géneros *Diversispora*, *Funneliformis*, *Glomus* y *Pacispora* tienen un origen de germinación muy parecido, sin embargo, difieren en tamaño, agrupación, color y número de capas<sup>18</sup>, factores que en este caso hicieron posible su identificación y clasificación. Tanto los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* fueron reconocidos por el tamaño de sus esporas y por el origen a partir de células bulbosas, ambos géneros presentan esporas de gran tamaño, pero poseen característica que difieren entre ellas, un ejemplo claro es que las *Gigasporas* halladas poseen una pared externa totalmente lisa<sup>18</sup>, mientras que en el género *Scutellospora* está reportado la existencia de esporas con pared lisas y ornamentadas, además las *Scutellospora* al ser aplastada durante el proceso de preservación, demostraron 3 paredes germinales en el interior de la espora, propias de este género<sup>36</sup>.

Especies de los géneros *Acaulospora*, *Glomus*, *Gigaspora* y *Scutellospora*, ya han sido reportadas anteriormente en sistemas agroforestales del Ecuador<sup>28</sup>, y de las esporas correspondientes a estos géneros, se llegó a identificar ciertas especies de HMA, sin embargo, se presume que la especie *Acaulospora alpina* es reportada por primera vez en zonas del trópico ecuatoriano. Una especie aislada en este estudio fue identificada como *Gigaspora margarita*, se conoce poco de la presencia de esta especie en Ecuador, y del género *Scutellos-*

**Figura 3.** Esporas HMA representativas de los sectores seleccionados. a) *Acaulospora alpina*; b) *Acaulospora scrobiculata*; c) *Acaulospora spinosa*; d) *Entrophospora infrequens*; e) *Diversispora tortuosa*; f) *Diversispora celata*; g) *Diversispora sp.*; h) *Pacispora robiginia*; i) *Gigaspora margarita*; j) *Scutellospora sp.*; k) *Ambispora sp.* [1]; l) *Ambispora sp.* [2]; m) *Funneliformis geosporus*; n) *Claroideoglossum lamellosum*; o) *Glomus sp.* [1]; p) *Glomus sp.* [2].



pora no se logró identificar las especies halladas. Sin embargo hay mención del género *Gigaspora* y *Scutellospora* en estudios realizados a palmito en Santo Domingo de los Tsachilas<sup>37</sup>, y en otros estudios realizados en la provincia de los Ríos, que también demuestran la presencia de *Gigaspora* y *Scutellospora* en sus muestras de suelo<sup>38</sup>.

En Latinoamérica, la *Diversispora tortuosa* ha sido reportada en estudios realizados a monocultivos de maíz en Brasil<sup>39</sup>, y la *Diversispora celata*, junto a las especies *Funneliformis geosporus*, y *Entrophospora infrequens* han sido reportadas en un estudio doctoral realizado en Colombia<sup>40</sup>, al igual que especies de los géneros *Claroideoglossum*, *Ambispora* y *Pacispora*, que si bien no han sido identificados en su totalidad, se conoce de su presencia en los estudios ya mencionados.

## Conclusiones

Los niveles medio de fósforo y nitrógeno al igual que los valores de pH, materia orgánica y conductividad eléctrica presentes en las zonas de estudios son adecuados para la proliferación de HMA. Sin embargo, se encontró una baja densidad de esporulación en los suelos rizosféricos analizados. Mientras que el porcentaje de micorrización total en raíces estuvo por encima del 50% en todos los sitios estudiados. En lo que respecta a la diversidad se identificaron 10 géneros y 15 especies de HMA en los lugares evaluados, lo que pone de manifiesto la diversidad de estos microorganismos en el trópico húmedo ecuatoriano.

## Referencias bibliográficas

1. Van Der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D. & Van Straalen, N. M. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 11, 296–310 (2008).
2. Vertel, M. & Pérez, A. Evaluación de la colonización de micorrizas arbusculares en pasto *Bothriochloa pertusa* (L.) A. Camus. *Rev. MVZ Córdoba* 15, 2165–2174 (2010). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69318985004>
3. Van der Heijden, M. et al. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Lett. to Nat.* 396, 69–72 (1998). doi: 10.1038/23932
4. Barrer, S. E. El Uso de Micorrízicos Arbusculares Como Una Alternativa Para La Agricultura. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 7, 124–126 (2009). <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v7n1/v7n1a14.pdf>
5. Porter, W. The 'most probable number' method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Aust. J. Soil Res.* 17, 515–519 (1979). doi: 10.1071/SR9790515
6. Bravo Velásquez, E. La biodiversidad en el Ecuador. (Universidad Politécnica Salesiana, 2014). [http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6788/1/La Biodiversidad.pdf](http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6788/1/La%20Biodiversidad.pdf)
7. Alarcón, P. Perfil Territorial del Cantón Pallatanga. (2013). [http://repositorio.cedia.org.ec/bitstream/123456789/853/1/Perfil territorial PALLATANGA.pdf](http://repositorio.cedia.org.ec/bitstream/123456789/853/1/Perfil%20territorial%20PALLATANGA.pdf)
8. Centro del Agua y Desarrollo Sustentable. Proyecto de Evaluación de Vulnerabilidad y Reducción de Riesgo de Desastres a Nivel Municipal en el Ecuador. (2013). <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1>
9. Gerdemann, J. W. & Nicolson, T. H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46, 235–244 (1963). doi: 10.1016/S0007-1536(63)80079-0

10. Furlan, V., Bartschi, H. & Fortin, J.-A. Media for density gradient extraction of endomycorrhizal spores. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 75, 336–338 (1980). doi: 10.1016/S0007-1536(80)80102-1
11. Guerra S., B. E. & Chacón V., M. R. Simbiosis micorrízica arbuscular y acumulación de aluminio en *Brachiaria decumbens* y *Manihot esculenta*. *Biotechnol. en el Sect. Agropecu. y Agroindustrial* 10, 87–98 (2012). [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612012000200011&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612012000200011&lng=en&nrm=iso)
12. Koske, R. E. & Tessier, B. A Convenient, Permanent Slide Mounting Medium. *Mycol. Soc. Am. Newsl.* 34, 59 (1983). [http://ccb.ucr.edu/soillabfiles/labprotocol/slide\\_mounting.doc](http://ccb.ucr.edu/soillabfiles/labprotocol/slide_mounting.doc).
13. Phillips, J. M. & Hayman, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55, 158–161 (1970). doi: 10.1016/S0007-1536(70)80110-3
14. McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L. & Swan, J. A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115, 495–501 (1990). doi: 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x
15. Morton, J. B. International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal (INVAM) - West Virginia University. INVAM (2000). Available at: <http://invam.wvu.edu/>.
16. Blaszkowski, J. Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota), Endogone and Complexes species deposited in the Department of Plant Pathology, University of Agriculture in Szczecin, Poland. *ZOR* (2003). Available at: <http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/index.html>.
17. Méndez Cortés, H. Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares asociados al cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) en dos ecosistemas tropicales de Veracruz, México. (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN, 2012). <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/3102>
18. SEMARNAT. Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Secretaría de medio ambiente y recursos naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. 15–16 (2002). <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/libros2009/021.pdf>
19. Garzón, L. Importancia de las micorrizas arbusculares (MA) para un uso sostenible del suelo en la amazonia colombiana. *Luna Azul* 42, 217–234 (2016). [http://www.cazalac.org/mwar\\_lac/fileadmin/document](http://www.cazalac.org/mwar_lac/fileadmin/document)
20. Hajiboland, R., Aliasgharzadeh, N., Farsad Laiegh, S. & Poschenrieder, C. Colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improves salinity tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Plant Soil* 331, 313–327 (2010). doi: 10.1007/s11104-009-0255-z
21. Heikham, E., Bhoopander, G. & Kapoor, R. Ultrastructural evidence for AMF mediated salt stress mitigation in *Trigonella foenum-graecum*. *Mycorrhiza* 23, 71–86 (2013). doi: 10.1007/s00572-012-0449-8
22. Habte, M. & Osorio, N. W. Arbuscular Mycorrhizas : Producing and Applying Arbuscular Mycorrhizal Inoculum. *Coll. Trop. Agric. Hum. Resour.* 47 (2001). ISBN: 192932510X. <https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/SCM-5.pdf>
23. Martínez, L. B. & Pugnaire, F. I. Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Ecosistemas* 18, 44–54 (2009). <http://revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/65>.
24. Santos, J. C., Finlay, R. D. & Tehler, A. Molecular analysis of arbuscular mycorrhizal fungi colonising a semi-natural grassland along a fertilisation gradient. *New Phytol.* 172, 159–168 (2006). doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01799.x
25. Fitzsimons, M. S., Miller, R. M. & Jastrow, J. D. Scale-dependent niche axes of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 158, 117–127 (2008). doi: 10.1007/s00442-008-1117-8
26. Miller, S. P. Arbuscular mycorrhizal colonization of semi-aquatic grasses along a wide hydrologic gradient. *New Phytol.* 145, 145–155 (2000). doi: 10.1046/j.1469-8137.2000.00566.x
27. Prieto-Benavides, O. O. et al. Identificación de hongos micorrízicos arbusculares en sistemas agroforestales con cacao en el trópico húmedo Ecuatoriano. *Agron. Mesoam.* 23, 233–239 (2012). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43724664002>
28. Perez, C. A., Rojas, S. J. & Montes, V. D. Hongos formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el caribe colombiano. *Rev. Colomb. Cienc. Anim* 3, 366–385 (2011). <http://dialnet.unirioja.es/servlet/oaiart?codigo=3817504>
29. Su, Y.-Y., Sun, X. & Guo, L.-D. Seasonality and host preference of Arbuscular Mycorrhizal Fungi of five plant species in the inner Mongolia steppe, China. *Brazilian J. Microbiol.* 42, 57–65 (2011). doi: 10.1590/S1517-83822011000100008
30. Bago, B., Pfeffer, P. E. & Shachar-Hill, Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol.* 124, 949–958 (2000). doi: 10.1104/pp.124.3.949
31. León Velandia, D. Evaluación y caracterización de micorrizas arbusculares asociadas a yuca (*Manihot esculenta* sp) en dos regiones de la Amazonia Colombiana. (Pontificia Universidad Javeriana, 2006). <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis296.pdf>
32. Sieverding, E. & Oehl, F. Revision of *Entrophospora* and description of *Kuklospora* and *Intraspora*, two new genera in the arbuscular mycorrhizal Glomeromycetes. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 80, 69–81 (2006). <http://pub.jki.bund.de/index.php/JABFQ/article/view/2192>
33. Walker, C. et al. Molecular phylogeny and new taxa in the Archaeosporales (Glomeromycota): *Ambispora fennica* gen. sp. nov., *Ambisporaceae* fam. nov., and emendation of *Archaeospora* and *Archaeosporaceae*. *Mycol. Res.* 111, 137–53 (2007). doi: 10.1016/j.mycres.2006.11.008
34. Schübler, A. & Walker, C. The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. The Royal Botanic Garden Edinburgh 22, 24–26 (2010). [http://www.amf-phylogeny.com/species\\_infos/higher\\_taxa/funneliformis\\_claroideoglomus\\_rhizophagus\\_redeckeria.pdf](http://www.amf-phylogeny.com/species_infos/higher_taxa/funneliformis_claroideoglomus_rhizophagus_redeckeria.pdf)
35. Walker, C. & Sanders, F. E. Taxonomic concepts in the Endogonaceae : III . The separation of *Scutellospora* gen. nov. from *Gigaspora* Gerd. & Trappe. *Mycotaxon* 27, 169–182 (1986). <https://www.researchgate.net/publication/285329919>
36. Pailacho Cedeño, F. I. Evaluación de la efectividad de las micorrizas arbusculares nativas sobre el desarrollo y estado nutritivo del palmito (*Bactris gasipaes* HBK) en esta de vivero, en Santo Domingo de los Tsachilas. (Escuela Politécnica del Ejército, 2010). <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2892/1/T-ESPE-IASA-II-002332.pdf>
37. Prieto Benavides, O. et al. Inoculación de *Brachiaria decumbens* con hongos formadores de micorriza arbuscular nativos del trópico húmedo ecuatoriano. *Rev. Cienc. y Tecnol.* 4, 9–18 (2011). [http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2\\_Inoculación\\_Brachiaria.pdf](http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_Inoculación_Brachiaria.pdf)
38. Salas Méndez, D. F. Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares e sua relação com atributos do solo em área de milho sob monocultivo e em consórcio com forrageiras no cerrado. (Universidade de Brasília, 2016). <http://repositorio.unb.br/handle/10482/21425>
39. Ramírez Gómez, M. M. Evaluación de la diversidad de Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA) y su relación con el establecimiento de simbiosis con *Physalis peruviana* L. (Universidad Nacional de Colombia, 2014). <http://www.bdigital.unal.edu.co/40192/1/41706338.2014.pdf>

Recibido: 30 agosto 2017

Aprobado: 28 enero 2018

## RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

# Determinación de coeficientes de degradación de materia orgánica en el río Negro (municipio de Rionegro, Colombia)

## Determination of kinetics coefficients of organic matter degradation in Negro river (municipality of Rionegro, Colombia)

Carlos Augusto Benjumea Hoyos

DOI. 10.21931/RB/2018.03.01.10

**Resumen:** En el presente estudio fueron determinados los coeficientes de desoxigenación en cinco diferentes estaciones de monitoreo sobre el río Negro (municipio de Rionegro, Antioquia). Se emplearon cuatro metodologías diferentes para la determinación de estas constantes: diferencias logarítmicas, mínimos cuadrados, método de Thomas y puntos de Rhame. La metodología de las diferencias logarítmicas arrojó coeficientes altos, con una variación de resultados amplia. Mientras que las metodologías de los mínimos cuadrados y puntos de Rhame presentaron los mejores ajustes en términos de la constante K y los valores obtenidos se encuentran dentro del rango de aguas superficiales con baja carga orgánica reportados por otros autores. Adicionalmente se evaluaron variables ambientales in situ y en laboratorio, con resultados generales de oxígeno disuelto alto, bajas temperaturas, un sistema acuático tendiente a la neutralidad y baja carga de sólidos en disolución. La relación  $DBO_5/DBO_u$  fue baja, indicando una baja presencia de material orgánico susceptible de ser oxidado por microorganismos de vía aerobia.

**Palabras clave:** Coeficientes de desoxigenación, DBO, Materia orgánica, Río Negro.

**Abstract:** This research deals with studies intending to determine the coefficients of deoxygenation into five different monitoring stations in Negro river (municipality of Rionegro, Antioquia). Four methodologies were used to determine this constants: logarithmic differences, minimal squares methods, Thomas method and Rhame points. The methodology of the different logarithmic showed high coefficients with a wide variation on results. While the methods of least square and Rhame points method were the most appropriate in terms of the K constant and the values obtained were within the range of surface waters with low organic load reported by other authors. Additionally environmental variables in situ and laboratory were evaluated, with overall results of high dissolved oxygen, low temperatures, a water system with a neutrality pH and low solids loading in solution. The  $BOD_5/BOD_u$  ratio was low, indicating a low presence of organic material capable of being oxidized by aerobic microorganisms.

**Key words:** BOD, Coefficients of deoxygenation, Negro river, Organic matter.

### Introducción

En este trabajo se evalúa la velocidad de degradación de la materia orgánica en diferentes estaciones del río Negro (municipio de Rionegro, Antioquia), mediante el análisis de la Demanda Bioquímica de Oxígeno en diferentes épocas climáticas. Adicionalmente, se determinan los coeficientes cinéticos que relacionan el consumo de materia orgánica en corrientes de alta montaña (río Negro, Antioquia).

El municipio de Rionegro se encuentra localizado en la cordillera central de los andes al oriente del departamento de Antioquia. Cuenta con un área total de 196 km<sup>2</sup>, hace parte de la subregión del altiplano de oriente, la cual está integrada por los municipios de El Retiro, La Ceja, La Unión, El Carmen de Viboral, El Santuario, Marinilla, Guarne, San Vicente y Concepción. El suelo urbano de Rionegro está localizado a las coordenadas 6°9'18"N 75°22'48"O, a una altura de 2125 msnm la precipitación promedio anual varía entre 1800 y 2500 milímetros y una temperatura media de 17 °C; sus suelos son derivados de cenizas volcánicas con alta resistencia a la erosión<sup>1,2</sup>.

El río Negro es la más importante fuente de agua del municipio del mismo nombre. Históricamente dividía el valle en dos: El Valle de Llanogrande y el Valle de San Nicolás. Nace un poco al sur de la región y por el costado oriental de la cordille-

ra de Las Palmas a unos 2800 msnm, en el Cerro Vaca. Corre en dirección nordeste y es alimentado por el lado derecho por las quebradas del Hato, La Pereira y Cimarronas. Por la izquierda recibe las quebradas Tablazo, Tablacito, Chachafruto, Malpaso, La Mosca y La Porquera<sup>3</sup>.

Las corrientes de esta cuenca se han visto afectadas por el cambio del uso del suelo en los últimos años debido al crecimiento urbanístico, la acelerada industrialización y al aumento de la población rural proveniente principalmente del Valle de Aburrá (Antioquia, Colombia), lo que conlleva a una mayor presión sobre las fuentes superficiales. El río Negro es fuente de abastecimiento para el municipio del mismo nombre, adicionalmente, parte de caudal es transferido a la cuenca del río Aburrá, mediante trasvase a la planta de tratamiento Ayurá que abastece una porción importante de la zona sur del Valle de Aburrá. Esta misma corriente, en su tramo final alimenta el embalse El Peñol, el cual tiene usos recreativos, paisajísticos y de generación de energía; principalmente. En su recorrido el río Negro recibe la contaminación doméstica de unos centros poblados con crecimiento acelerado en los últimos años (sector Llanogrande) e industrial que se asienta en las subcuencas afluentes de manera marcada y en el tramo medio bajo de su

<sup>1</sup> Grupo de Investigación Limnología y Recursos Hídricos, Docente Asistente programa de Ingeniería Ambiental, Universidad Católica de Oriente, Rionegro, Colombia. orcid.org/0000-0002-3702-4300.



recorrido, esta carga contaminante puede afectar la disponibilidad de oxígeno disuelto en la corriente, el cual es vital para el sostenimiento de la vida acuática.

El oxígeno disuelto constituye uno de los principales parámetros a evaluar en el comportamiento de la calidad del agua de los cuerpos hídricos, interviniendo en diferentes procesos, como son la reaeración, la fotosíntesis, la respiración, la demanda béntica y la degradación de la materia orgánica, entre otras<sup>4,5</sup>.

Existen parámetros y constantes cinéticas en las ecuaciones que describen y gobiernan los procesos físicos y químicos en una corriente de agua, las cuales no siempre pueden determinarse teóricamente o por medio de una expresión matemática. Tal es el caso de la constante de desoxigenación por demanda bental (SOD), que corresponde a la demanda de Oxígeno Disuelto (OD) por la descomposición de la materia orgánica contenida en los sedimentos en un ecosistema acuático. Esta juega un papel muy importante en la depleción del oxígeno disuelto cuando se realiza un balance de oxígeno en una corriente<sup>6</sup>.

Para el caso específico de la materia orgánica (vertimientos de aguas residuales, materia orgánica en la escorrentía superficial, etc.) se hace necesario realizar la medición de la Demanda Bioquímica de Oxígeno Carbonácea (DBOC) y Demanda Bioquímica de Oxígeno Nitrogenada (DBON), demanda béntica y sus constantes cinéticas asociadas comúnmente denominadas como  $K_1$ ,  $K_N$ ,  $K_B$  respectivamente, las cuales brindan información sobre la velocidad de degradación de la materia orgánica en un cuerpo de agua. Una buena aproximación al valor real de las constantes es imprescindible en un estudio de corrientes de agua, pues de ello dependerá la precisión de los resultados y predicciones que se efectúen de la calidad futura del agua<sup>7</sup>.

Para el río Negro, en particular, no se encuentran reportes de estudios experimentales de los coeficientes cinéticos por el material orgánico en la corriente (demanda de oxígeno), por lo cual los resultados de investigaciones en este sentido fortalecerían y complementarían los estudios y seguimiento que realiza la corporación autónoma regional Cornare (ente de control ambiental) en cuanto a los modelos implementados desde hace algún tiempo para predecir la calidad de este cuerpo de agua; los cuales propenden por la gestión, control y entendimiento del ecosistema acuático.

Para las simulaciones de calidad del agua y el diseño de sistemas de tratamiento biológico de efluentes de aguas resi-

duales, es de gran importancia obtener el parámetro que cuantifica la velocidad de oxidación de la materia orgánica por microorganismos<sup>5</sup>. La constante cinética de desoxigenación total, comúnmente denotada como  $K_c$  o  $K_1$ , mide la tasa o velocidad de degradación de la materia orgánica presente en un sistema acuático; este coeficiente debe estimarse a partir de la cuantificación de la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) durante un tiempo adecuado; usualmente 20 días.

La constante de desoxigenación  $K_c$  es indispensable para conocer la manera como se utiliza el oxígeno en la oxidación de la materia orgánica. Este valor es característico para cada tipo de desecho, siendo necesario determinarlo en cada caso específico. Una vez conocido el valor de  $K_c$  se puede estimar el valor de la demanda bioquímica de oxígeno remanente en una corriente de agua, aguas abajo de una descarga<sup>7</sup>.

## Materiales y métodos

Se definieron cinco estaciones de monitoreo a lo largo del río Negro, las cuales se encuentran ubicadas entre los municipios de El Retiro y Rionegro, en límites con el municipio de Marinilla. La definición de estos sitios se basó en información analizada de las diferentes campañas de monitoreo y control realizadas por la Corporación Autónoma de las Cuencas de los Ríos Negro y Nare Cornare, y lo propuesto por<sup>8</sup>. La tabla 1 presenta la descripción de los puntos de monitoreo y su respectiva nomenclatura.

Se realizaron dos campañas de muestreo, durante periodos climáticos contrastantes. Primer periodo inicio de lluvias hasta entrada época húmeda correspondiente a la época entre abril a mayo (fecha de monitoreo 24 de abril). Segundo periodo, representativo de aguas bajas, con escasa precipitaciones, correspondiente a la época del mes de junio y julio (fecha de monitoreo 29 de julio). De esta manera se tuvo un comparativo de los momentos hidrológicos característicos de la zona (bimodal), con lo que se caracterizó el sistema hídrico y la carga orgánica asociadas a estas épocas hidrológicas.

En cada estación se tomaron muestras compuestas de la columna de agua, las cuales fueron colectadas y almacenadas en recipientes plásticos debidamente rotulados y preservadas en una nevera con hielo a  $\pm 4^\circ\text{C}$ . Se garantizó la preservación de las muestras durante el transporte, para luego ser analizadas en el laboratorio de acuerdo a los procedimientos descritos en<sup>9</sup> en lo concerniente a la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO).

Tabla 1. Descripción Estaciones de Monitoreo

Nomenclatura	Nombre	Descripción
E 1	Montenevado	Kilómetro 5, jurisdicción del Municipio de El Retiro.
E 2	Charcomanso	Kilómetro 16, sector de Llanogrande. Jurisdicción del municipio de Rionegro,
E 3	Puente Real	Kilómetro 24, Jurisdicción del municipio de Rionegro, sector urbano.
E 4	Casa Mia	Kilómetro 25, Jurisdicción del municipio de Rionegro, sector urbano. Aportes de la quebrada La Pereira
E 5	Puente Autopista	Jurisdicción de los municipios de Rionegro y Marinilla. Recoge las descargas de las empresas circundantes.

**Tabla 2.** Principio de medición y características del Equipo. Parámetros *in situ*.

Parámetro	Metodología	Características
pH	Potenciométrica	Intervalo de pH de 2 a 14 unidades Pendiente -59 mV/pH (90 a 110% a 25 °C (77 °F) por valor teórico nemstiano
Potencial de óxido reducción	Potenciométrica	Electrodo de combinación digital con una referencia de Ag/AgCl, sensor de temperatura incorporado. Rango ± 1200 mV. Resolución 0,1 mV
Conductividad	Conectividad de 4 polos de grafito	Margen de conductividad 0,01 µS/cm a 200,0 mS/cm Constante de celda 0,40 cm-1 ± 10%
Oxígeno Disuelto	Oxígeno disuelto luminescente (LDO)	Intervalo de oxígeno disuelto 0,1 a 20 mg/l (ppm) Precisión del oxígeno disuelto ± 0,1 mg/l para 0 a 8 mg/L ± 0,2 mg/l para más de 8 mg/l
Porcentaje de Saturación de O <sub>2</sub>	Oxígeno disuelto luminescente (LDO)	1 a 200% de saturación resolución del % de saturación 0,1%
Temperatura del Agua	Sensor de temperatura	Rango de temperatura de funcionamiento 0 a 50 °C (32 a 122 °F) Precisión de temperaturas ± 0,3 °C (± 0,54 °F)

La prueba se realizó por duplicado para cada muestra tomada en las diferentes estaciones descritas anteriormente durante 20 días, mediante el bioensayo del método winkler<sup>9</sup>.

De acuerdo a resultados históricos obtenidos por Cornare, y complementados con un pre muestreo realizado el día 11 de marzo de 2013, se establecieron las diluciones necesarias para la cuantificación de la DBO en cada sitio de monitoreo. El volumen de muestra sembrado de muestra estuvo entre 100 y 200 ml para un volumen total con agua de dilución de 300 ml, según lo propuesto por los métodos estándar<sup>9</sup>.

Se realizaron los chequeos respectivos del agua de dilución para establecer la efectividad de la semilla utilizada y la técnica analítica; el método aplicado fue el de la solución de glucosa y ácido glutámico referenciado en el Standard Methods; en la cual se determina el consumo de oxígeno de la solución patrón.

#### VARIABLES FÍSICOQUÍMICAS DEL AGUA IN SITU:

Adicionalmente se tomaron muestras para la determinación de variables *in situ*. Se midieron el pH, temperatura del agua, conductividad, potencial de óxido reducción, oxígeno disuelto y porcentaje de saturación de oxígeno. Estas mediciones se realizaron mediante sondas multi paramétricas HACH HQ40d, las cuales fueron calibradas previamente antes de cada monitoreo. La tabla 2, presenta las principales características y principios de medición de las sondas utilizadas para la cuantificación de las variables *in situ*.

#### MÉTODOS PARA EL CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE DEGRADACIÓN K.

Para la determinación del coeficiente de desoxigenación global en cada estación se utilizaron los métodos de las diferencias logarítmicas<sup>10</sup>; mínimos cuadrados y pendiente de Thomas<sup>11</sup>; adicionalmente se empleó la metodología de los puntos de Rhame<sup>12</sup>. Para la cuantificación del coeficiente se utilizaron los valores medios de los resultados obtenidos en cada medida diaria de la DBO para cada época de monitoreo establecida (abril y junio).

Estas técnicas de cálculo se basan en la cinética de la reacción de la DBO carbonácea la cual es descrita ampliamente por diversos autores<sup>7, 10, 13, 14, 15, 16</sup>. El comportamiento de esta variable responde a una reacción de primer orden, ecuación 1.

Este proceso se basa en la degradación bioquímica de la materia orgánica; la cual es directamente proporcional a la cantidad de material orgánico aprovechable por los microorganismos presentes en el sistema (materia orgánica biodegradable).

$$\frac{dL}{dt} = -KL$$

Dónde:

L: concentración de la materia orgánica remanente (mg/l) en un tiempo t

dL/dt: velocidad de desaparición de la materia orgánica por oxidación biológica aerobia (dL/dt<0)

t: el tiempo de incubación (días)

K: constante de biodegradación (d<sup>-1</sup>), base e a 20°C

## Resultados y discusión

### Parámetros In Situ

Se determinaron diferentes variables ambientales en campo durante el procedimiento de toma y preservación de las muestras a analizar en laboratorio. Estos parámetros indican la calidad ambiental del sistema acuático en los diferentes puntos de monitoreo para las fechas específicas del trabajo en campo. La tabla 3 presentan los resultados obtenidos para cada una de estas variables durante los monitores de Abril y Junio de 2013.

En cuanto a los resultados obtenidos en campo, se observa como la temperatura del agua se encontró entre los 15.5 y 20.5 °C; valores típicos de esta zona que se caracteriza por tener un clima frío, las variaciones en este parámetro respondieron efectivamente a la hora del día en la cual fueron tomadas. Para el oxígeno disuelto y porcentaje de saturación de este gas, se puede apreciar como la concentración de este presenta una tendencia a la disminución conforme se avanza en las diferentes estaciones, este resultado es producto de los diferentes contrastes en términos de intervención antrópica que se encuentran en las diferentes estaciones de estudio, donde se inicia (estación Montenevado) con una zona con menor densidad poblacional y menores descargas; y se termina (estación Puente Autopista) en un sector donde se han recibido las

**Tabla 3.** Resultados parámetros *in situ*.

Estación	Oxígeno Disuelto (mg/l)			Saturación (%)			Temperatura del agua (°C)		
	Abr	Jul	Promedio	Abr	Jul	Promedio	Abr	Jul	Promedio
<b>Montenevado</b>	8.04	8.02	8.0	104.1	107.8	106.0	15.5	17.1	16.3
<b>Charco Manso</b>	8.7	7.05	7.9	119.8	93.6	106.7	18.1	16.6	17.4
<b>Puente Real</b>	6.42	6.58	6.5	92	89	90.5	20.2	18.41	19.3
<b>Casa Mía</b>	7.08	5.8	6.4	100.9	78.8	89.9	20.5	17.9	19.2
<b>Puente Autopista</b>	2.22	4.11	3.2	31.8	56.6	44.2	20.3	19	19.7
Estación	pH (unidades de pH)			Conductividad (us/cm)			Potencial de óxido reducción (mv)		
	Abr	Jul	Promedio	Abr	Jul	Promedio	Abr	Jul	Promedio
<b>Montenevado</b>	7.05	7.81	7.43	71.1	67.9	69.5	56.7	96.9	76.8
<b>Charco Manso</b>	7.5	7.33	7.42	60.9	33.6	47.3	64.6	122.9	93.8
<b>Puente Real</b>	7.26	7.28	7.27	66.5	46.6	56.6	98.3	110.9	104.6
<b>Casa Mía</b>	7.06	7.21	7.14	75.4	44.8	60.1	120.1	114.2	117.2
<b>Puente Autopista</b>	6.91	7.16	7.04	158.4	85.7	122.1	46.7	94.1	70.4

aguas servidas y tratadas del municipio de Rionegro y algunas empresas ubicadas en el sector. Los resultados encontrados con respecto a este gas durante 2013 son similares a estudios realizados por<sup>8, 2</sup>; y a los reportes que se encuentran en la base de datos de la corporación Cornare.

En términos generales el ambiente acuático analizado presenta tendencia a la neutralidad durante los dos monitoreos realizados, con valores medios que oscilaron entre 7.04 y 7.43 unidades de pH, en las estaciones Puente Autopista y Montenevado y tiene coherencia según lo reportado por<sup>1, 2</sup>. Este comportamiento se ve favorecido por la buena disponibilidad de oxígeno disuelto que desplaza el gas carbónico, y por ende evita la presencia de ácido carbónico, principal agente precursor de la acidez natural en las aguas.

La conductividad eléctrica puede considerarse como media y propia de ríos de alta montaña<sup>4</sup>, principalmente en las 4 primeras estaciones (Montenevado, Charco Manso, Puente Real y Casa Mía) con un rango promedio que se encontró entre 47.3 y 69.5 uS/cm. Por su parte la estación ubicada aguas abajo, Puente Autopista, registró los valores más altos para esta variable durante ambos periodos de estudio (158 y 85.7 uS/cm para abril y julio, respectivamente). Este comportamiento se debe principalmente a la ubicación del punto de estudio, pues al ubicarse aguas abajo, la concentración de iones aumenta progresivamente debido a la erosión del cauce, escorrentía de lluvias, vertimientos a la corriente, entre otros. El comportamiento de esta variable presenta similitud a lo presentado por Benjumea Hoyos en el 2017<sup>24</sup> en este mismo sistema hídrico.

En cuanto al potencial de óxido reducción este se encontró con valores positivos y un rango promedio para ambos periodos de estudio entre 70.4 y 117.2 mV; siendo la estación Puente Autopista la que registró los valores más bajos, esta característica se asocia principalmente a los bajos niveles de oxígeno disuelto<sup>17</sup>; no obstante los resultados indicaron que el sistema acuático presenta características oxidativas.

**Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) y Constante de Desoxigenación K.**

La figura 1 exhibe los perfiles longitudinales promedio obtenidos de las mediciones de DBO realizadas en laboratorio; los resultados promedio en el mes de abril y julio de 2013,

de la demanda biológica de oxígeno para el día cinco (DBO<sub>5</sub>) y veinte o última (DBO<sub>u</sub>); adicionalmente se presenta la fracción degradada entre el día quinto y día último mediante la relación DBO<sub>5</sub>/DBO<sub>u</sub>.

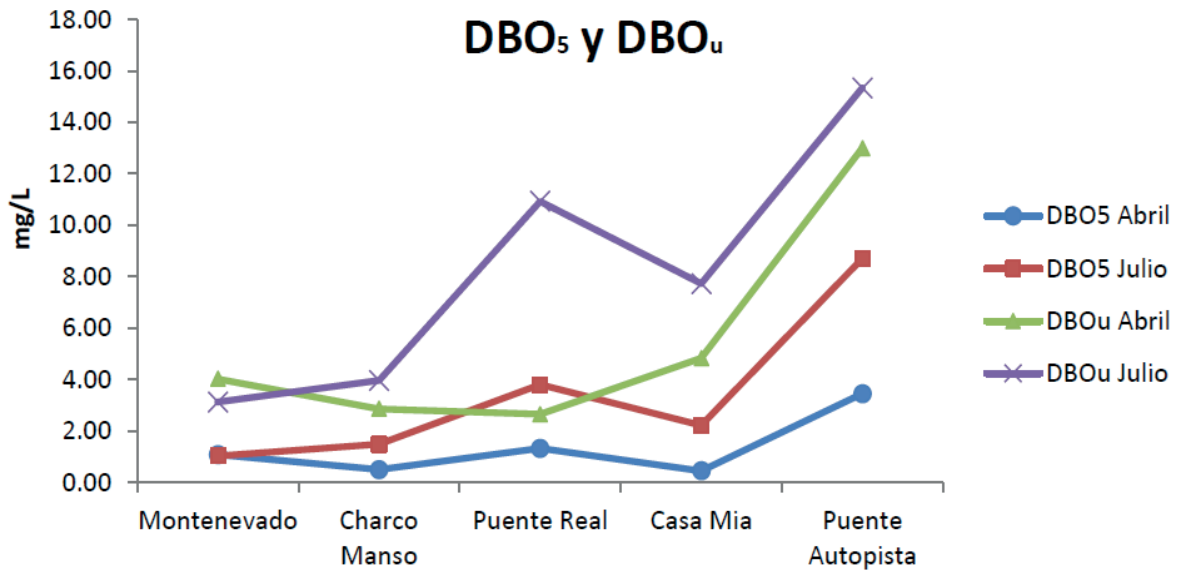
Como se puede observar en la figura 1; los resultados obtenidos reflejan un ambiente acuático con una carga orgánica muy baja, analizada como DBO. La estación con menor concentración promedio de DBO<sub>5</sub> fue Charco Manso (0.99 mg/L); mientras que la mayor concentración promedio de este mismo parámetro se obtuvo en Puente Autopista con un valor de 6.08 mg/L; este comportamiento es coherente con lo observado en cuanto a la concentración de oxígeno disuelto obtenida para cada punto de monitoreo, no obstante la estación Puente Autopista refleja concentraciones de este gas bajas para ambos periodos de estudio; con lo cual se podría inferir una alta concentración en el parámetro de la DBO<sub>5</sub>, resultado que no se obtuvo mediante el análisis en laboratorio. En cuanto a los resultados entre épocas climáticas época lluviosa (abril) y seca (julio), se evidencia una leve diferencia entre ambos periodos, con la tendencia a presentarse mayor concentración de DBO<sub>5</sub> durante julio en comparación a lo obtenido en abril, hecho que va ligado a la diferencia de caudal entre ambos periodos.

Resultados similares fueron reportados por<sup>8</sup> donde para la época lluviosa se obtuvieron valores por debajo de 13.2 mg/L como DBO<sub>5</sub>; en las mismas estaciones de monitoreo analizadas en el presente estudio; encontrándose esta última concentración en la estación Puente Autopista, es decir exhibe un comportamiento similar a lo encontrado durante 2013.

Otros estudios para corrientes de alta montaña, son los reportados por<sup>18</sup>, para la quebrada La Pereira (afluente del río Negro), en la cual obtuvieron resultados similares a los encontrados durante 2013; los promedios de las concentraciones históricas para la DBO<sub>5</sub> fueron de 9.78; 7.49 y 4.69 mg/L; para las estaciones aguas arriba PTAR, Pontezuela y Puente entrada Quirama, respectivamente. Estos resultados reflejan, que aunque estos cuerpos de agua son influenciados por vertimientos líquidos, tienen una buena capacidad de autodepuración y asimilación, favorecida por la baja temperatura y procesos de reaeración propios de ríos de montaña.

Los resultados obtenidos para la relación DBO<sub>5</sub>/DBO<sub>u</sub> indican la baja presencia de material orgánico con resultados igua-

Figura 1. Perfiles longitudinales de DBO promedio, monitoreos de abril y julio de 2013.



les o inferiores a 0.42 (42%); estos resultados dan una primera aproximación al coeficiente de desoxigenación o degradación K, pues al presentar valores bajos se infiere que la velocidad de degradación tendera a ser baja; ya que "si la velocidad de oxidación bioquímica es muy alta, el valor de la DBO<sub>5</sub> se acerca mucho al de la DBO final"<sup>10</sup>.

#### Constante de desoxigenación (K)

La tabla 4, presenta los resultados obtenidos para el coeficiente de desoxigenación en las cinco estaciones sobre el río Negro, utilizando cuatro metodologías diferentes; Diferencias Logarítmicas, Mínimos Cuadrados, Método de Thomas y Puntos de Rhame.

Para una mejor comprensión y análisis se presenta la figura 2; donde se exhiben los valores promedio del coeficiente de desoxigenación (K) y la DBO<sub>5</sub> para los monitoreos realizados en abril y junio de 2013 en las cinco estaciones de interés. Se aprecia cómo, en términos generales, los resultados obtenidos para el coeficiente de desoxigenación fueron bajos guardando coherencia con lo obtenido en cuanto a las concentraciones de DBO obtenidas en cada sitio de monitoreo.

En cuanto a los resultados obtenidos por las diferentes metodologías aplicadas (tabla 4), se aprecia que la metodología de las diferencias logarítmicas arrojó los mayores valores del coeficiente de degradación de materia orgánica, con un promedio que vario entre 0.078 y 0.683 día<sup>-1</sup>. Mientras que la metodología de los puntos de Rhame presentó los valores más bajos; con variaciones desde 0.016 y 0.08 día<sup>-1</sup>. Para los resultados relacionados con las estaciones, se observa como

la estación Casa Mia y Puente Autopista arrojaron los mayores resultados en cuanto a los coeficientes de degradación. Mediante las metodologías de Thomas y puntos de Rhame se obtuvieron coeficientes de 0.326 y 0.080 día<sup>-1</sup>, respectivamente para la estación Casa Mia; y mediante los mínimos cuadrados se obtuvo un resultado de 0.085 día<sup>-1</sup> en la estación Puente Autopista.

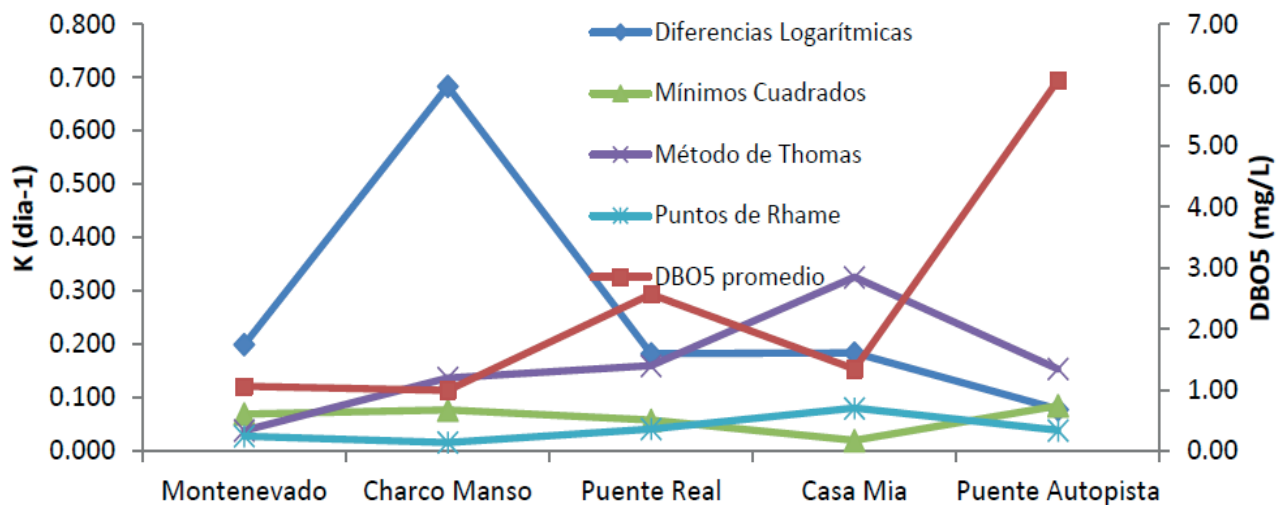
En términos generales los resultados obtenidos para el coeficiente de degradación orgánica K mediante las metodologías de los mínimos cuadrados, Thomas y puntos de Rhame ofrecieron resultados promedio bajos entre 0.016 y 0.16 día<sup>-1</sup> (con excepción de la estación Casa Mia en el método de Thomas 0.326 día<sup>-1</sup>); estos valores son típicos para sistemas de aguas superficiales con baja carga orgánica y tiene concordancia con lo reportado por<sup>12, 19, 20</sup>. Estos resultados son coherentes con lo encontrado en las mediciones de campo en cuanto a lo que a oxígeno disuelto se refiere (tabla 4, figura 1) y en lo que respecta a la demandada biológica de oxígeno y relación DBO<sub>5</sub>/DBO<sub>u</sub> obtenida en laboratorio, las cuales fueron bajas e indican baja presencia de materia orgánica susceptible de ser degradada por los microorganismos. Los valores se encuentran clasificadas dentro del rango de sistemas con tratamiento primario (K entre 0.1 – 0.3 día<sup>-1</sup> y DBO<sub>5</sub>/DBO<sub>u</sub> 0.63) y lodos activados (K entre 0.05 – 0.1 día<sup>-1</sup> y DBO<sub>5</sub>/DBO<sub>u</sub> 0.31); según lo descrito por<sup>11, 16, 21</sup>.

La tabla 5, presenta los resultados de la varianza (s<sup>2</sup>) y la desviación estándar (s) obtenida para cada una de las cuatro metodologías empleadas durante los dos periodos de monitoreo (abril y julio). Se aprecia como para ambos periodos de

Tabla 4. Resultados Coeficiente de Desoxigenación K, en Cinco Estaciones Sobre el río Negro

Estación	Metodología Constante de Desoxigenación K (día <sup>-1</sup> )											
	Diferencias Logarítmicas			Mínimos Cuadrados			Método de Thomas			Puntos de Rhame		
	Abr	Jul	Promedio	Abr	Jul	Promedio	Abr	Jul	Promedio	Abr	Jul	Promedio
Montenevado	0.083	0.315	0.199	0.046	0.092	0.069	0.034	0.042	0.038	0.047	0.008	0.028
Charco Manso	0.881	0.485	0.683	0.037	0.116	0.077	0.101	0.172	0.137	0.024	0.007	0.016
Puente Real	0.105	0.259	0.182	0.057	0.058	0.058	0.269	0.050	0.160	0.041	0.041	0.041
Casa Mia	0.254	0.113	0.184	0.003	0.036	0.020	0.256	0.395	0.326	0.142	0.018	0.080
Puente Autopista	0.087	0.069	0.078	0.013	0.156	0.085	0.228	0.079	0.154	0.008	0.069	0.039

**Figura 2.** Perfiles longitudinales del coeficiente de desoxigenación (K) promedio y la DBO<sub>5</sub> promedio.



estudio la metodología de las diferencias logarítmicas presentó las variaciones de coeficientes más altas con 0.31 y 0.15 para abril y julio respectivamente. Los resultados obtenidos mediante esta metodología se ajustaron más a coeficientes de degradación propios de efluentes de aguas residuales según lo reportado por<sup>22</sup> y no a ambientes de aguas superficiales con baja carga orgánica como se discutió anteriormente.

**Tabla 5.** Varianza ( $\sigma^2$ ) y Desviación Estándar ( $\sigma$ ) por Metodología y Periodo de Estudio

Metodología	Abril		Julio	
	$\sigma^2$	$\sigma$	$\sigma^2$	$\sigma$
Diferencias Logarítmicas	0.094	0.31	0.022	0.15
Mínimos Cuadrados	0.0004	0.02	0.0018	0.04
Método de Thomas	0.009	0.09	0.017	0.13
Puntos de Rhame	0.002	0.05	0.001	0.02

Mientras que la desviación estándar obtenida mediante las metodologías de los mínimos cuadrados (0.02 y 0.04 para abril y julio respectivamente) y puntos de Rhame (0.05 y 0.02 para abril y julio respectivamente) indican un mejor ajuste y representación de las características encontradas en cuanto al oxígeno disuelto y DBO<sub>5</sub>; además de guardar concordancia con estudios similares para aguas superficiales con baja carga orgánica<sup>12, 19, 20, 23</sup>. Estos resultados pueden asociarse a las características propias de la corriente, pues al corresponder a un río de montaña, las bajas temperaturas y características morfológicas de la corriente favorecen la disolución del oxígeno disuelto, gas fundamental para todos los procesos de oxidación de la materia orgánica por vía biológica. Adicional a esto, la gestión y control de vertimientos que se realiza en la región por parte de la autoridad ambiental Cornare, influye drásticamente en el control de la contaminación por vertimientos de tipo doméstico e industrial gracias al Acuerdo 198 de abril de 2008; en el cual se establecen remociones mínimas del 95% en términos de DBO<sub>5</sub> y Sólidos suspendidos totales.

## Conclusiones y recomendaciones

Se realizó la cuantificación experimental de la constante de desoxigenación en cinco estaciones del río Negro (Montenevado, Charco Manso, Puente Real, Casa Mia y Puente Autopista), por medio de cuatro metodologías diferentes: diferencias logarítmicas, método de Thomas, mínimos cuadrados y puntos de Rhame. Siendo las dos últimas metodologías las más adecuadas en la representación del coeficiente, pues se aproxima a resultados similares en corrientes de agua superficial con baja intervención; además de presentar menos dispersión en los datos obtenidos.

Los rangos promedio de los coeficientes obtenidos mediante las metodologías de mínimos cuadrados y puntos de Rhame oscilaron entre 0.016 y 0.085 d<sup>-1</sup>; los cuales corresponden a velocidades de degradación de corrientes superficiales con baja carga orgánica. Los resultados para la DBO<sub>5</sub> y DBO<sub>u</sub> indicaron una baja carga orgánica, las cual se asoció, en términos generales, con altas concentraciones de oxígenos disueltos y cercanos a la saturación de este gas. Los resultados obtenidos guardaron coherencia con lo reportado por otros estudios en el río Negro. Los resultados obtenidos para la relación DBO<sub>5</sub>/DBO<sub>u</sub> fueron bajos, indicando una baja velocidad de degradación, tal como se obtuvo mediante los resultados experimentales mediante las metodologías utilizadas.

Los rangos promedio de los coeficientes obtenidos mediante las metodologías de mínimos cuadrados y puntos de Rhame oscilaron entre 0.016 y 0.085 d<sup>-1</sup>; los cuales corresponden a velocidades de degradación de corrientes superficiales con baja carga orgánica. Los resultados para la DBO<sub>5</sub> y DBO<sub>u</sub> indicaron una baja carga orgánica, las cual se asoció, en términos generales, con altas concentraciones de oxígenos disueltos y cercanos a la saturación de este gas. Los resultados obtenidos guardaron coherencia con lo reportado por otros estudios en el río Negro. Los resultados obtenidos para la relación DBO<sub>5</sub>/DBO<sub>u</sub> fueron bajos, indicando una baja velocidad de degradación, tal como se obtuvo mediante los resultados experimentales mediante las metodologías utilizadas.

## Agradecimientos

El autor agradece el apoyo durante todo el proceso del proyecto al semillero de investigación en Recursos Hídricos del programa de ingeniería ambiental de la Universidad Católica de Oriente, y a la corporación autónoma regional CORNARE por el apoyo y suministro de información.

## Referencias bibliográficas

1. Montoya, Y., Acosta, Y., Zuluaga, E., & Garcia, A. (2007). Evaluación de la biodiversidad de insectos acuáticos y de calidad fisicoquímica y biológica del Río Negro (Antioquia-Colombia). Universidad Católica de Oriente (23), 71-86.
2. Montoya, Y., Acosta, Y., y Zuluaga, E., (2011). Evolución de la calidad del agua en el río Negro y sus principales tributarios empleando como indicadores los índices ICA, el BMWP/COL y el ASPT. *Caldasia* 33(1):193-210.
3. Municipio de Rionegro, departamento de Antioquia. Recuperado el 12 de abril de 2014 desde <http://www.rionegro.gov.co/>
4. Roldán, G. & Ramírez, J. (2008). *Fundamentos de Limnología Neotropical*. Editorial de la Universidad de Antioquia. 2 da edición. Colombia, 440 pp.

5. Duncan Mara (2004). Domestic Wastewater Treatment in Developing Countries. Earthscan. London.
6. Caldwell J. M., Doyle M. C. (1994). Sediment oxygen demand in the lower Willamette river, Oregon. U.S. Geological Survey Water Resources Investigations Report 95-4196. Portland, Oregon.
7. Salazar A. Á., (1984) Contaminación de Recursos Hídricos Modelos y Control. Asociación de Ingenieros Sanitarios de Antioquia AINSA, Medellín.
8. Castrillon, A. M.; Wills, A. (2006). Modelación de la calidad del agua de la cuenca del Río Negro a través del modelo de simulación QUAL 2E [archivo de computador] Tesis/Informe de práctica. U de A. Medellín : [s. n.].
9. American Public Health Association (APHA), the American Water Works Association (AWWA), and the Water Environment Federation (WEF) (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22 ed.
10. Ramalho R.S. (1996). Tratamiento de Aguas Residuales. Ed. Reverté. Barcelona, 707 pp.
11. Romero, J.A. (1999). Tratamiento de Aguas Residuales. Teoría y Principios de Diseño. Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería.
12. Corporación Autónoma Regional Del Valle Del Cauca, (2007). Proyecto De Modelación Matemática Del Río Cauca – Pmc- Fase III. Convenio Interadministrativo 029 de junio 14 de 2005 entre la CVC y la Universidad del Valle. Estimación Experimental De Las Constantes Cinéticas De La Calidad Del Agua Del Río Cauca.
13. Romero Rojas (1998). Acuitratamiento por Lagunas de Estabilización. 3ª Edición. Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería. Colombia.
14. Saracho M., Romero K., Flores M., Rodríguez C. (2011). Coeficiente Cinético para Diseño de Unidades de Tratamiento Biológico de Efluentes Cloacales. Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente. Argentina. 15, 71-78.
15. Streeter, H. W. and Phelps, E. B. (1925). A study of the Pollution and Natural Purification of the Ohio River, III. Factors Concerning the Phenomena of Oxidation and Reaeration. U.S. Public Health Service. Pub. Health Bulletin No 146, february, 1925. Reprinted by U.S., Dhew, PHA, 1958.
16. Chapra, S. (1997). Surface Water-Quality Modeling. McGraw-Hill International Editions Civil Engineering Series. United States, 844 pp.
17. Dodds W. K. y Whiles M. R. (2010). Aquatic Chemistry and Factors Controlling Nutrient Cycling: Redox and O<sub>2</sub>. Freshwater Ecology (Second Edition), Concepts and Environmental Applications of Limnology. A volume in Aquatic Ecology. 289-321.
18. Garcia, L., y Villegas, N. E. (2008). Demanda de oxígeno por sedimentos de un ambiente lotico del altiplano de San Nicolas quebrada La Pereira, municipios: La Ceja - El Carmen de Viboral - Rionegro [archivo de computador] Tesis/Informe de práctica. U de A. Medellín: [s. n.].
19. Hewitt J.P. y Hunterf J.V: (1975). Comparison of the methods used to calculate first order bod equation constants. Water Research 9, 683-687.
20. Jorgensen S.E., y Bendoricchio, G. (2001). Fundamentals of Ecological Modeling. Third edition. Elsevier Science Ltd. Netherlads.
21. Thomann, R. y Mueller, J. (1987). Principles of Surface Water Quality Modeling and Control. Harper Collins Publishers Inc. United States. 644 pp.
22. Rosas de Alva S. G., Barceló I. D., Bussy A., Solís H. E., López E (2007). Estudio Cinético Comparativo de la Degradación de la Materia Orgánica en un Sistema Lagunar Prototipo. Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales. 1, Número 2. Universidad Nacional Autónoma de México.
23. Battersby N.S. (1990). A review of biodegradation kinetics in the aquatic environment. Chemosphere, 21(10-11), 1243-1284.
24. Benjumea Hoyos C. A.; Álvarez G. (2017). Demanda de oxigeno por sedimentos en diferentes tramos del río Negro, Rionegro, Antioquia, Colombia. Producción + Limpia - Julio - Diciembre. Vol.12, No.2 – 131-146

Recibido: 11 octubre 2017

Aprobado: 10 enero 2018

## RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

### Ozonoterapia en hernias discales. Ozone therapy in herniated discs.

Danilo Ruiz Reyes<sup>1</sup>, María Elena Romo<sup>2</sup>, Hugo Pereira Olmos<sup>3</sup>.

DOI. 10.21931/RB/ 2018.03.01.11

**Resumen:** En este trabajo se demostró los efectos terapéuticos de la ozonoterapia paravertebral lumbar profunda en el control del dolor en las hernias discales de la región lumbo sacra. Fueron incluidos en el análisis un total de 100 pacientes, tratados en el transcurso doce meses (enero a diciembre 2016) en el Centro Médico Ozonocenter de Quito, Ecuador, (71 hombres y 29 mujeres) de entre 21 a 60 años de edad, diagnosticados con hernias discales protruidas y prolapsadas a nivel L4-L5 y L5-S1; con signos clínicos característicos de esta patología. Estudios de resonancia magnética simple (MRI) de la región lumbo sacra se utilizaron para corroborar la presencia de las lesiones. Previo al tratamiento, la intensidad del dolor de los pacientes fue valorada con la escala EVA (Escala Visual Analógica). Para medir el efecto terapéutico se utilizó el Score MacNab modificado evaluando los cambios referidos por los pacientes en la reducción del dolor. Las calificaciones obtenidas fueron: 64 pacientes reportan excelentes resultados terapéuticos (64 %; IC 95 % = 54 - 73), 13 con buena respuesta terapéutica (13 %; IC 95 % = 7 - 19), 14 pacientes con una respuesta parcial (14 %; IC 95 % = 7 - 21) y pobre respuesta 9 pacientes (9 %; IC 95 % = 4 - 15). El tratamiento del dolor lumbar con ozonoterapia somática y paravertebral en hernias discales lumbares resulta ser un método efectivo en el 77 % de los casos, (64 % con excelente respuesta y 13 % con buena respuesta). El tratamiento del dolor lumbar con ozonoterapia somática en hernias discales lumbares, resulta ser un método efectivo en el 77 % de los casos, (64 % con excelente respuesta y 13 % con buena respuesta).

**Palabras clave:** hernias discales, ozonoterapia, región lumbo sacra, score MacNab modificado.

**Abstract:** The objective of this work was to demonstrate the therapeutic effectiveness of paravertebral ozonotherapy in the control of pain in cases of discs' herniation in the lumbar sacral region. A total of 100 patients treated in twelve months (January at December 2016) in Ozonocenter Medical Center to Quito, Ecuador, (71 males and 29 females), were collected between 20 and 60 years old, diagnosed with herniated lumbar disc in stage of protrusion and prolapse at level L4-L5 and L5-S1; with clinically signs of the disease. Nuclear magnetic resonance studies (MRI) of lumbar sacral region were used to corroborate the presence of the illness. Before the treatment, the patient's pain intensity was measured with VAS (Visual Analogue Scale). The Modified MacNab Score was used to determine the therapeutic effect. The scores were: 64 patients reported excellent therapeutic results (64 %; IC 95 % = 54 - 73), 13 patients had good therapeutic results (13 %; IC 95 % = 7 - 19), 14 patients had average results (14 %; IC 95 % = 7 - 21) and 9 had no response (9 %; IC 95 % = 4 - 15). The analysis concludes that the treatment of low back pain with somatic ozone therapy for herniated discs turns out to be an effective method in the 77% of the cases, (64 % with excellent response and 13 % with good response).

**Keywords:** disc herniation, lumbar sacral region, ozone therapy, score MacNab modifies.

### Introducción

El ozono (O<sub>3</sub>), es un oxígeno triatómico de uso médico, que se obtiene mediante una descarga eléctrica de alto voltaje sobre el oxígeno medicinal, generado en un equipo especial de electromedicina, el cual produce ozono con distintas concentraciones graduados acordes a la patología y al tratamiento. La ozonoterapia no produce efectos adversos, teniendo pocas contraindicaciones como embarazo, déficit de G6PD (Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa), hipertiroidismo e hipertensión arterial no controlada<sup>1, 2, 3</sup>.

Las hernias discales han sido clasificadas por estadios o fases en protrusión, prolapso, extrusión y secuestro, siendo la fase de protrusión, la inicial en todas las hernias, comprimiendo (identando) el canal medular, no afectando las raíces nerviosas, provocando fundamentalmente dolor lumbar y de hecho en esta etapa no son susceptibles de cirugía y su tratamiento es conservador.

La utilización del Ozono en el tratamiento de las hernias de

disco lumbares y cervicales en fase de protrusión y prolapso, está sustentada por una amplia casuística, la regresión de la sintomatología dolorosa es rápida y las ventajas respecto a los métodos tradicionales, incluida la cirugía, están representadas por su eficacia y la ausencia de efectos colaterales<sup>4</sup>.

Los efectos del Ozono en las hernias discales son:

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

Aumenta la capacidad de la sangre para absorber y transportar oxígeno (hiperoxigenación local) mejorando la micro circulación y las funciones celulares, además de disminuir el edema.

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

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

<sup>3</sup> Docente Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica, Quito, Ecuador.

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

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

Según últimas investigaciones en el área, se ha demostrado que el ozono provoca la activación de pequeñas cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los tejidos, activando la regeneración tisular como un mecanismo de defensa<sup>5,6</sup>.

## Materiales y métodos

El presente estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Institución, cumplió con lo establecido en la Declaración de Helsinki, última versión correspondiente a la Asamblea General de Edimburgo, Escocia, de Octubre del 2000<sup>7</sup>.

Para su realización se solicitó a los pacientes el consentimiento informado por escrito y oral según establecen las normas de Buenas Prácticas Clínicas, después de haber sido informados sobre lo que se le realizaría durante la investigación, se garantizó no divulgar los datos personales de los pacientes al informar o publicar los resultados de esta. La información relacionada con su identidad fue tratada confidencialmente, empleándose códigos para identificarlos, esta fue manejada sólo por el personal que participó en la misma, el cual contaba con experiencia clínica en el manejo de la ozonoterapia y fue entrenado en la evaluación de los pacientes y la aplicación del tratamiento.

En el presente estudio descriptivo, se incluyó una muestra homogénea de 100 pacientes (71 hombres y 29 mujeres), de entre 21 a 60 años de edad, tratados en el Centro Médico Ozonocenter de Quito, Ecuador, en el curso de doce meses (enero a diciembre 2016), diagnosticados con hernias discales protruidas y prolapsadas a nivel L4-L5 y L5-S1; con signos clínicos característicos de esta patología. Se excluyeron del análisis, pacientes menores de 20 y mayores de 60 años de edad e igualmente aquellos con hernias discales grandes en fase de extrusión o con otros daños coexistentes como discartrosis. Igualmente fueron excluidos pacientes que tenían dolor lumbar o articular de otro origen.

Estudios de resonancia magnética simple (MRI) de la región lumbo sacra se utilizaron para corroborar la presencia de las lesiones.

En cada paciente incluido en el estudio se utilizó la siguiente técnica para el tratamiento con ozonoterapia:

1. Se efectuó una infiltración bilateral del compartimento

del psoas o espacio de Bonitot, denominada infiltración somática lumbar profunda, con 15 cc de ozono a una concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{cc}$ , a 3 cm de las apófisis espinosas en localizaciones variables dependiendo de la ubicación del conflicto disco radicular a nivel L4 o L5, siguiendo la técnica de Capdevilla o Nizora modificado. Para el efecto se utilizaron agujas TSK No. 22 x 7 cm.

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

3. En todos los pacientes se utilizó un esquema de 10 sesiones, las primeras 5 sesiones en forma semanal y las siguientes en forma quincenal.

La mezcla de O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> fue obtenida a partir de oxígeno médico utilizando un generador de ozono marca Bioline BL-X5.

Previo a la intervención, los pacientes fueron estratificados según la intensidad del dolor, para ello se utilizó la escala EVA (Escala Visual Analógica), clasificando a los pacientes en los niveles de dolor: Intenso, Tolerable y Mínimo.

Para medir la respuesta al tratamiento con Ozonoterapia se utilizó los criterios MacNab Modificados, siguiendo los parámetros de la tabla 1.

## Resultados

La tabla 2, demuestra que el 76% de los participantes estaban entre 40 y 60 años de edad, con un promedio de 47  $\pm$  10.02 años Más del 70% fueron hombres. Se hace evidente que las discopatías (hernias discales) son más frecuentes en personas mayores de 40 años, en las cuales fisiológicamente se presenta un progresivo deterioro de la estructura de los discos vertebrales.

La tabla 3, demuestra que cerca de dos tercios de los pacientes tenían intenso dolor antes de la intervención. Los hombres, porcentualmente presentaron mayor intensidad de dolor antes de la infiltración (79.36% del total, llegaron con dolor intenso), diferencia que al análisis estadístico se muestra importante (RP = 2.9; IC 95% = 1,2 – 7,1; valor de p = 0.016).

El dolor producto de las hernias discales es usualmente intenso, dependiendo del umbral doloroso de cada persona, la compresión del material herniado sobre el saco dural o raíces nerviosas provoca un importante dolor inicialmente lumbar y luego lumbociático que muchas veces se torna incapacitante, afectando las labores normales del individuo. Los datos evidencian que el dolor se presenta más intensamente en los pacientes de género masculino, por un lado debido al mayor porcentaje de hombres que mujeres en el estudio, además es posible igualmente que se deba a los antecedentes laborales y deportivos más intensos en los hombres. Se podría pensar que las mujeres son más tolerantes al dolor, evidencia que puede

**Tabla 1.** Criterios MacNab Modificados

Nivel de respuesta	Criterios
<b>Excelente</b>	No hay dolor; ni restricción de la actividad
<b>Buena</b>	Dolor ocasional de suficiente intensidad para interferir con la capacidad del paciente para hacer su trabajo normal o su capacidad para disfrutar las horas de ocio.
<b>Regular</b>	Mejora de la capacidad funcional, pero existe dolor intermitente de gravedad suficiente para reducir o modificar actividades laborales o de ocio.
<b>Pobre</b>	No hay mejoría o mejoría insuficiente para permitir aumento de las actividades.



**Tabla 2.** Distribución de participantes por Grupos Etarios y Sexo

Edad Años	Total Pacientes	Hombres		Mujeres	
		Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
21-30	8	6	6,0	2	2,0
30-39	16	10	10,0	6	6,0
40-49	29	29	29,0	9	9,0
50-60	47	35	35,0	12	12,0
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>71</b>	<b>71,0</b>	<b>29</b>	<b>29,0</b>

**Tabla 3.** Nivel del dolor antes de la intervención con Ozonoterapia, distribución por sexo.

Nivel del dolor pre-intervención con ozonoterapia	Total pacientes		Hombres		Mujeres	
	Nº de pacientes	Porcentaje	Nº de pacientes	Porcentaje	Nº de pacientes	Porcentaje
<b>Intenso</b>	63	IC 95 % = 53 - 73	50	70,4	13	44,8
<b>Tolerable</b>	27	IC 95 % = 18 - 35	15	21,1	12	41,4
<b>Mínimo</b>	10	IC 95 % = 4 - 16	6	8,5	4	13,8
<b>Total</b>	<b>100</b>		<b>71</b>	<b>100,0</b>	<b>29</b>	<b>100,0</b>

ser motivo de innumerables supuestos.

La figura 1 expresa, que, aunque los hombres llegan con mayor intensidad de dolor, la respuesta es muy parecida, esto se explicaría ya que la terapia produce un beneficio similar para todas las personas, indistinto de su género.

En la tabla 4, se puede apreciar que el 77 % de los pacientes tuvo una adecuada respuesta (entre excelente y buena) al tratamiento con ozonoterapia.

No se evidenció efectos indeseables en ninguno de los pacientes. En todos los casos se realizaron controles de resonancia magnética simple (MRI) de columna lumbosacra luego de terminada la terapia. Los 77 pacientes que tuvieron mejoría de la sintomatología dolorosa, demostraron en las MRI que el material herniado se redujo con un alto nivel de descompresión raquímedular.

activas, estimándose que 8 de cada 10 personas sufrirá a lo largo de su vida algún episodio de dolor lumbar y una alta proporción serán debidas a hernias discales<sup>8</sup>.

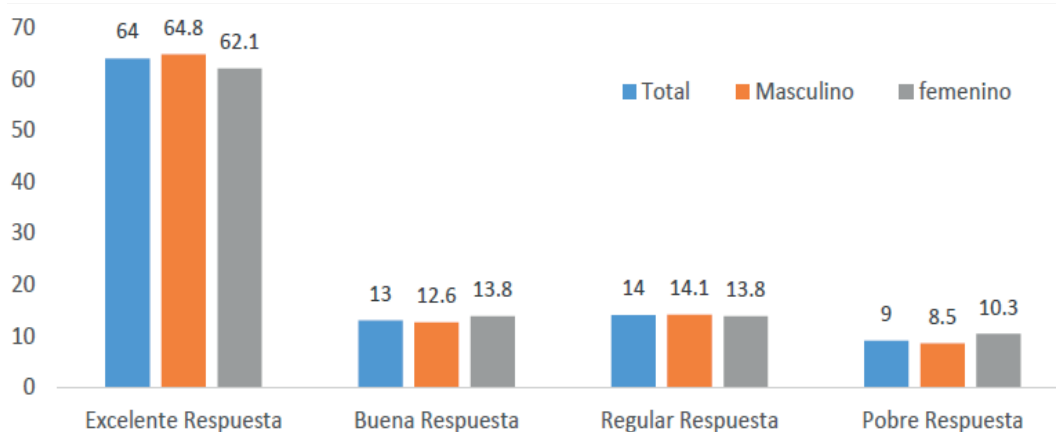
En el tratamiento convencional del dolor lumbar o lumbociático asociado a hernias discales, se utilizan diversos tipos de fármacos acordes a la intensidad del dolor y las características particulares de cada paciente, los mismos que pueden ser analgésicos, aines, corticoides, relajantes musculares, antidepressivos, neuromoduladores, derivados opiáceos, etc; todos ellos como un tratamiento sintomático con efectos limitados, sin un verdadero beneficio para los pacientes.

La ozonoterapia como método terapéutico ha obtenido un gran desarrollo y difusión en los últimos años, siendo reconocida y utilizada en varios países. En la actualidad existen más de 40 asociaciones internacionales que agrupan a los profesionales que practican esta terapia. La acción más reciente para unificar los criterios en cuanto a métodos y procedimientos, fueron recogidos en la "Declaración de Madrid sobre la Ozonoterapia", firmado en Madrid, España en julio de 2015, durante el Segundo Encuentro Internacional de Sociedades Médicas

## Discusión

El dolor lumbar una de las dolencias que ocasiona mayor índice de ausentismo laboral en poblaciones económicamente

**Figura 1.** Porcentaje de respuesta al dolor con tratamiento de Ozonoterapia, por sexo.



**Tabla 4.** Tipo de respuesta al tratamiento con ozonoterapia

Tipo de respuesta al tratamiento con ozonoterapia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
<b>Excelente</b>	64 (IC 95 % = 54 - 73)	64
<b>Buena</b>	13 (IC 95 % = 7 - 19)	77
<b>Regular</b>	14 (IC 95 % = 7 - 21)	91
<b>Pobre</b>	9 (IC 95 % = 4 - 15)	100

de Ozonoterapia. En la actualidad es el único documento de consenso existente y sus recomendaciones y prácticas son aplicadas en diferentes lugares del mundo<sup>9,10</sup>.

El tratamiento con Ozono, es una novedosa terapia siendo las discopatías (hernias discales) y su sintomatología dolorosa, una de las entidades donde se ha evidenciado mayor utilidad, técnica que se fundamenta en la administración de ozono en la musculatura paravertebral contigua al sitio de la lesión y /o en la emergencia de las raíces nerviosas de los nervios raquídeos que formarán el nervio ciático, utilizando diversas técnicas, con lo cual se logra bloquear y reducir el dolor y la sintomatología propia del padecimiento, producto de la compresión (identación) raquimedular, además de reducir el material herniado por mecanismos ya explicados anteriormente, logrando descomprimir la medula o sus raíces nerviosas, cesando el efecto mecánico compresivo y con ello desapareciendo la sintomatología propia del padecimiento<sup>11,12</sup>.

Los efectos del ozono inyectado en la musculatura paravertebral han sido estudiados y respaldados por varios estudios fisiológicos efectuados en Italia por el Dr. Velio Bocci<sup>14,15,16,17</sup>, y por otros investigadores en el área<sup>14,15,16,17</sup>.

Actualmente constituye una de las mejores opciones para el tratamiento del dolor provocado por las hernias discales, con la ventaja de ser un tratamiento ambulatorio, los beneficios son muy vastos y no se han descrito efectos adversos, siempre que se realice correctamente y en los casos que se justifique. No provoca las complicaciones (fibrosis postquirúrgica, fístulas de líquido cefalorraquídeo, riesgo anestésico) que puede tener la cirugía<sup>18,19,20,21</sup>. Estadísticamente, a nivel internacional, el índice de mejoría del dolor lumbar con ozonoterapia fluctúa entre el 70 y 80%<sup>22</sup>.

El ozono en hernias discales puede combinarse con otros medicamentos y/o tratamientos buscando mejores beneficios para los pacientes<sup>23,24,25,26,27,28</sup>.

Se han descrito técnicas de ozonoterapia intradiscal (discolisis), las cuales deben ser efectuadas en quirófano, con el apoyo de sedación y equipos de fluoroscopia para guiar las agujas de punción, sin embargo, no han demostrado ser más efectivas que la técnica de ozonoterapia paravertebral y/o somática.

Un Meta análisis efectuado por Steppan et al., en el cual realiza un estudio comparativo de varios trabajos efectuados utilizando ozono en hernias discales, concluye que la técnica de ozonoterapia intradiscal o intraforaminal tiene un nivel de Evidencia II-3 (Evidencia obtenida por estudios diagnósticos son inciertos); mientras que la técnica de ozonoterapia paravertebral a nivel lesional tiene un nivel de evidencia II-1 (Evidencia es obtenida por estudios apropiadamente conducidos y de tamaño adecuado<sup>29</sup>).

En el análisis efectuado en nuestro Centro Médico se concluye que el tratamiento del dolor con ozonoterapia en las hernias discales lumbares en fase de protrusión y prolapso con

la técnica combinada somática y paravertebral lumbar resulta ser un método efectivo en el 77 % de los casos, además de ser un procedimiento mínimamente invasivo, constituyendo una excelente alternativa a las terapias tradicionales, proporcionando a los pacientes una mejor calidad de vida.

Hay indicios, no medidos en este estudio, que los pacientes que responden adecuadamente al tratamiento con las infiltraciones de ozono, también tuvieron una reducción en el tamaño de las hernias discales y por ende en la compresión raquimedular.

Se necesitan más estudios sobre esta temática para establecer protocolos de tratamiento que puedan ser aplicados con seguridad en otras instituciones, públicas y privadas. Estudios que incluyan aspectos importantes como costo/beneficio.

## Referencias bibliográficas

- Bocci V. Ozone a new medical drug. Springer. Vol. 53, Journal of Chemical Information and Modeling. Holanda; 2005. 1699 p.
- Stockburger D, Del H, Del USO, En O, Medicina L a, Usos PY. Terapia con ozono. Ateramex, editor. Alicante, España; 2008. 83 p.
- Viebahn R. El uso del ozono en medicina. [Internet]. Vol. Cuarta edi. Munich, Alemania; 2007. 156 p. Available from: <http://es.slideshare.net/andreagalletakora/el-uso-del-ozono-en-medicina1>
- Rosato ML, Mainini M, Luongo M, Mascolo L, Mattera S, Schiaffino L. Oxygen-ozone therapy : our experience in the treatment of hard-root conflicts m er ci us e on m er on al. 2016;1:1-2.
- Borrelli E. Mechanism of Action of Oxygen Ozone Therapy in the Treatment of Disc Herniation and Low Back Pain. Acta Neurochir (Wien). 2011;108:123-5.
- Valdenassi L, Franzini M, Simonetti V, Ricevuti G. Oxygen-ozone therapy: paradoxical stimulation of ozone. Ozone Ther [Internet]. 2016;1(1):2. Available from: <http://www.pagepressjournals.org/index.php/ozone/article/view/5837>
- Helsinki D. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Asoc Médica Mund [Internet]. 2000;1-8. Available from: [http://www.reumatologia.org.ar/userfiles/file/investigacion-farmacoclinica/inv\\_clinica\\_faltante.doc](http://www.reumatologia.org.ar/userfiles/file/investigacion-farmacoclinica/inv_clinica_faltante.doc)
- Gregory DS, Seto CK, Wortley GC, Shugart CM. Acute lumbar disk pain: Navigating evaluation and treatment choices. Am Fam Physician. 2008;78(7).
- ICSCO3. Declaración de Madrid sobre la ozonoterapia 2015. 2nd ed. (International Scientific Committee of Ozone Therapy). Madrid, España: Grafox Imprenta, SL; 2015. 52 p.
- Schwartz A, Mariño RQ. La Ozonoterapia frente a la Legislación: Hacia un análisis global de derecho comparado. Rev Española Ozonoterapia. 2008;1-41.
- Mejía G, Panoso A GA. Bloqueo del compartimiento del psoas. Rev Mex Anestesiología. 2010;33(1):31-8.
- Benavides G. Manejo de la hernia discal lumbar con ozonoterapia paravertebral y epidural: reporte de un caso. Rev Española Ozonoterapia. 2015;5(1):33-8.

13. Bocci V, Borrelli E, Zanardi I, Travagli V. The usefulness of ozone treatment in spinal pain. *Drug Des Devel Ther* [Internet]. 2015 Jan 15 [cited 2016 Sep 22];9:2677–85. Available from: <https://www.dovepress.com/the-usefulness-of-ozone-treatment-in-spinal-pain-peer-reviewed-fulltext-article-DDDT>
14. Bonetti M, Fontana A, Cotticelli B, Dalla Volta G, Guindani M, Leonardi M. Intraforaminal O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> versus periradicular steroidal infiltrations in lower back pain: Randomized controlled study. *Am J Neuroradiol*. 2005;26(5):996–1000.
15. Zambello A, Fara B, Tabaracci G, Bianchi M. Epidural Steroid Injection vs Paravertebral O<sub>2</sub> O<sub>3</sub> Infiltration for Symptomatic Herniated Disc Refractory to Conventional Treatment A Prospective Randomized Study. *Riv Ital di Ossigeno-Ozonoterapia*. 2006;3(5):123–7.
16. Travagli V, Zanardi I, Bocci V. A realistic evaluation of the action of ozone on whole human blood. *Int J Biol Macromol*. 2006;39(4–5):317–20.
17. Hidalgo-Tallón FJ, Torres LM. Ozonoterapia en medicina del dolor. Revisión. *Rev Soc Esp Dolor Revisión Rev Soc Esp Dolor*. 2013;20(206):291–300.
18. Magalhaes FNDO, Dotta L, Sasse A, Teixeira MJ, Fonoff ET. Ozone therapy as a treatment for low back pain secondary to herniated disc: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pain Physician* [Internet]. 2012;15(2):E115–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22430658>
19. Schwartz A. La ozonoterapia y su fundamentación científica. *Rev Española Ozonoterapia*. 2012;2(1):163–98.
20. Lu. W; Li. YH; margin of the facet joint. 2010;2(3):109–12.
21. Jimenez, S; Toro, M; Baiz, C.Soc R, Dolor E. Eficacia de la infiltración de ozono paravertebral lumbar y en puntos gatillos como coadyuvante del tratamiento en pacientes con dolor lumbar crónico y lumbociatalgia crónica en el síndrome doloroso miofascial aislado o acompañado de otras patologías. *Rev Soc Española del Dolor*. 2014;21(1):23–38.
22. Paoloni M, Sante L Di, Cacchio A, Apuzzo D, Marotta S, Razzano M, et al. Intramuscular Oxygen-Ozone Therapy in the Treatment of Acute Back Pain With Lumbar Disc Herniation. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(13):1337–44.
23. Gallucci M, Limbucci N, Zugaro L, Barile A, Galzio R. Sciatica : Treatment with Intradiscal and Intraforaminal Injections of Steroid and Oxygen-Ozone versus Steroid Only 1 Purpose : Methods : Results : Conclusion : Radiology. 2007;242(3):907–13.
24. Muto M, Ambrosanio G, Guarneri G, Capobianco E, Piccolo G, Annunziata G RA. Low back pain and sciatica: treatment with intradiscal-intraforaminal O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> injection. Our experience. *J Neuroradiol*. 2008;113:695–706.
25. Canovas, L. Alonso, M. Couñago, S. Rojas JOAH. Alivio Del Dolor Discogénico : Experiencia En 51 Casos. *Rev Soc Española del Dolor*. 2015;22(1):27–31.
26. Ovando E, Luis J, García S, Leonardo L, Ortiz A. Reporte de 147 casos de éxito en el Centro de la Columna. *Rev Mex Med Física y Rehabil*. 2014;26(1):24–37.
27. Schwartz A. Ozono y factores de crecimiento ozonizados en el tratamiento de la hernia discal y discartrosis de la columna lumbar. *Rev Española Ozonoterapia*. 2013;3:7–19.
28. Herrera, M; Valenzuela, L; Alvarez J. Ozonoterapia y magnetoterapia en pacientes con hernias discales. *Medisan*. 2016;20(6):826–32.
29. Steppan J, Meaders T, Muto M, Murphy KJ. A Metaanalysis of the Effectiveness and Safety of Ozone Treatments for Herniated Lumbar Discs. *J Vasc Interv Radiol*. 2010;

**Recibido: 30 mayo 2017**

**Aprobado: 15 octubre 2017**

## CASE REPORTS / REPORTE DE CASO

# Ozonoterapia coadyuva al tratamiento antirretroviral del SIDA. Caso clínico Ozone therapy contributes to the antiretroviral treatment of AIDS. Clinical case

Esteban Waliszewski Zamorano, Marco Antonio Conde Pérez, Daisy Irais Nava Morales

DOI. 10.21931/RB/2018.03.01.12

**Resumen:** El ozono, se aplica en el tratamiento médico debido a sus propiedades como modulador inmune, antiséptico, por promover la angiogénesis, favorecer la formación de colágeno, liberación de citosinas y factores de crecimiento, regulación de hormonas endocrinas y desencadenar la formación de antioxidantes por el propio organismo, así como por inactivar virus. El VIH, es un virus que ataca principalmente el sistema inmune del humano dejándolo vulnerable ante muchos tipos de infecciones. A un paciente masculino de 23 años de edad con el cuadro clínico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, se aplicó 120 µg de ozono cada tercer día en 18 ocasiones como la ozonoterapia, alternando la autohemoterapia y aplicación ozono por vía rectal. Al terminar el tratamiento, los análisis clínicos comparativos antes y después del tratamiento revelaron, que la ozonoterapia coadyuvó al tratamiento antirretroviral (TAR) aplicado por el Sector Salud, logrando significativa mejoría en la cuenta viral y la respuesta inmune.

**Palabras clave:** ozonoterapia, VIH, cuenta viral.

**Abstract:** Ozone is applied in medical treatments due to its properties as an immune modulator, antiseptic, to promote angiogenesis, favoring the collagen production, release of cytokines and growth factors, regulation of endocrine hormones and trigger the antioxidants formation by organisms, as well as by inactivating viruses. HIV is a virus that mainly attacks the human immune system leaving it vulnerable to many types of infections. To a 23-year-old male patient with the clinical signs of Acquired Immunodeficiency Syndrome, 120 µg of ozone every third day on 18 occasions as ozone therapy was applied, alternating autohemotherapy and ozone rectal application. At the end of the treatment, comparative clinical trials before and after treatment revealed that ozone therapy contributed to the antiretroviral treatment (ART) applied by the Health Sector, achieving significant improvement in viral count and immune response.

**Key words:** ozone therapy, AIDS, viral count.

## Introducción

El ozono, es un gas hecho de tres átomos de oxígeno en una estructura cíclica (O<sub>3</sub>), siendo una especie de oxígeno reactivo de la atmósfera. La exposición aguda inhalatoria al ozono, produce inflamación pulmonar y daño celular al epitelio de la cavidad nasal, a los bronquios y bronquiolos, así como a los macrófagos alveolares originados por una mínima concentración de antioxidantes y baja capacidad para su neutralización<sup>1</sup>. El ozono, se disuelve físicamente en agua formando el agua ozonizada, encontrando su utilidad como desinfectante. A diferencia del oxígeno, el ozono reacciona inmediatamente con los fluidos biológicos: plasma, linfa, orina, donde el oxígeno atómico, se comporta como un átomo muy reactivo. El ozono reacciona con ácidos grasos poliinsaturados, antioxidantes: ácidos ascórbico y úrico, compuestos que contienen los grupos tiol (-SH) tales como cisteína y glutatión reducido (GSH), albúmina, hidratos de carbono, enzimas, ADN y ARN. Todos estos compuestos actúan como donadores de electrones y se someten a la reacción de oxidación formando hidrógeno peróxido, siendo éste una especie de oxígeno reactivo (ROS)<sup>2</sup>. En la molécula del oxígeno reactivo (ROS), es fundamental el peróxido de hidrógeno, que es un oxidante no radical capaz de actuar como un mensajero del ozono responsable de obtener varios beneficios biológicos y terapéuticos<sup>3,4</sup>. Los compuestos del oxígeno reactivo (ROS) tienen en el organismo una vida media muy corta, pero este es suficiente para dañar componentes

celulares vitales y por ello su generación debe ser controlada, calibrando durante el tratamiento con precisión la cantidad de ozono aplicado (µg/ml del gas por ml de sangre en proporción 1:1). Además, se recomienda aumentar la capacidad antioxidante de la sangre, administrando por vía oral los antioxidantes antes y durante la terapia con ozono. La inducción de ion hidroxilo (HO<sup>-</sup>) después de un estrés oxidativo, se ha descrito como uno de los antioxidantes más importantes en la defensa de la enzima protectora. Por lo tanto, los lípidos peroxidados ejercen un efecto neuroinmunomodulador revelado en un sentir de bienestar anunciado por los pacientes durante la terapia con ozono<sup>5</sup>. Los niveles submicromolares de lípidos peroxidados pueden ser estimulantes y beneficiosos, mientras que los niveles altos pueden ser tóxicos. Por ello, la ozonoterapia utilizada en el tratamiento médico alternativo con concentraciones óptimas de ozono, es un procedimiento crucial para lograr el resultado terapéutico: mientras las concentraciones bajas son prácticamente inútiles y las demasiado altas pueden provocar un efecto negativo (malestar, fatiga). De este modo, las dosis deben estar justo por encima del nivel umbral para producir un estrés oxidativo agudo, el cual es transitorio, pero capaz de desencadenar efectos biológicos deseados sin manifestar la toxicidad y servir como coadyuvante o agente terapéutico en diversos tratamientos incluyendo el SIDA<sup>6,7</sup>.

La evidencia clínica ha demostrado, que el poder terapéuti-

<sup>1</sup> Médico especialista en Medicina Estética y Aplicación Médica del Ozono

<sup>2</sup> Médico especialista en Medicina Estética, Estudios de Postgrado, Instituto de Estudios Superiores en Medicina, Xalapa Ver., México

co del ozono consiste en mejorar simultáneamente el suministro y la circulación del oxígeno, en la liberación de autacoides que son sustancias con estructura y actividades farmacológicas muy diversas como hormonas locales y agentes autofármacos, factores de crecimiento y citoquinas, en la reducción del estrés oxidativo crónico y en modificar la respuesta biológica. Se ha supuesto, que el ozono tiene un efecto activador de enzimas antioxidantes y ha actuado como inmunomodulador y activador metabólico celular<sup>8,9,10</sup>. Se conoce que el ozono activa del sistema inmunológico, en las enfermedades inmunopresivas tales como enfermedades virales crónicas, cáncer y SIDA<sup>7,11,12</sup>. Los resultados del tratamiento de Guven y otros<sup>10</sup> revelan claramente que el ozono tiene un efecto benéfico en el proceso del combate de daños en el organismo mejorando los mecanismos de defensa antioxidante<sup>13,14,15</sup>.

El blanco del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), son las células que poseen en su superficie la molécula CD4, la cual se localiza en las principales células del sistema inmune, destruyéndolas y provocando el desequilibrio en el organismo con el desarrollo de la enfermedad. El virus del VIH cuando infecta, se inserta en el genoma del aparato reproductor de la célula que invade, en busca de destruir el sistema de defensa, donde no llegan medicamentos ni vacunas. De ahí, el uso de ozono, como modulador del sistema inmune, se puede aplicar como una terapia complementaria además de sus funciones como antioxidante y antimicrobiano<sup>16,17</sup>. Los pacientes infectados están en un estrés oxidativo crónico, por lo tanto, se altera su sistema de defensa antioxidante. Todo esto influye en algunos aspectos de la patogénesis de la enfermedad, en la replicación viral, la respuesta inflamatoria, la disminución de la proliferación linfocitaria, la pérdida de la función inmune, la apoptosis, la pérdida crónica de peso y el incremento en la sensibilidad a la toxicidad de los medicamentos. En este sentido, la aplicación del ozono como activador de los mecanismos antioxidantes y modulador del sistema inmune, encuentra su aplicación como terapia complementaria al producir una hiperconcentración de oxígeno y mayor aporte de oxígeno a los tejidos que normalmente no lo reciben por el daño, lo mismo ocurre con la parestesia, pues el ozono al entrar a la sangre reacciona con los ácidos grasos insaturados convirtiéndolos en ozonidos y luego en peróxidos. Esta reacción hace que la hemoglobina libere oxígeno adicional al torrente sanguíneo y la mayor concentración de los peróxidos favorece la oxidación celular y fortalece el sistema inmune<sup>13,18</sup>. Por lo anterior, el objetivo del estudio fue aplicar el tratamiento de la ozonoterapia a un paciente con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, en el pleno desarrollo de la enfermedad y bajo un tratamiento antirretroviral (TAR) habitualmente aplicado por el Sector Salud.

## Caso Clínico

Se presenta en el consultorio un paciente masculino de 23 años de edad con el cuadro clínico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. El paciente reveló antecedentes clínicos de infección por VIH desde hace 12 meses y el tratamiento antirretroviral (TAR) desde hace 6 meses aplicado por el Sector Salud. Con gran insistencia el paciente solicitó que se le aplique el tratamiento con ozono. El paciente firmó su consentimiento y responsabilidad para comenzar el tratamiento. Al aplicar la ozonoterapia, se trató de restaurar el daño al sistema inmunológico del paciente producido por el VIH. En el mes de febrero del 2017, se inició la ozonoterapia; con la autohemoterapia mayor y el tratamiento con ozono por vía rectal, aplicada en 18 ocasiones cada tercer día en forma alterna como 6 jeringas de 60 ml a 20 µg de ozono tanto en la autohemoterapia mayor como por la vía rectal. Antes de inicio del tratamiento y al concluir el tratamiento, se ordenó realizar los análisis clínicos para comparar la eficiencia de ozonoterapia aplicada paralelamente, para coadyuvar al tratamiento antirretroviral (TAR) aplicado por el Sector Salud. Los resultados comparativos, se muestran en la tabla 1.

Con el objetivo de mejorar el estado general de salud, al paciente, se le administró dieta adecuada, teniendo en cuenta que en esta enfermedad merman los niveles de hierro y vitamina B12 dados por las infecciones oportunistas, por el tratamiento antirretroviral, mal nutrición y posibles sangrados. Una posible diarrea puede causar serios problemas de desnutrición y deshidratación provocadas por infecciones del tubo digestivo que se deben a la presencia de bacterias, parásitos, hongos o virus, así como por el tratamiento antirretroviral, algunos antibióticos, intolerancia a los lácteos, los trastornos pancreáticos y el estrés emocional. Las diarreas llevan a la fatiga y pérdida de peso, al igual que las infecciones oportunistas y la alimentación inapropiada. Por ello, los pacientes con infección por VIH requieren en su dieta más grasa, carbohidratos, proteínas, vitaminas y abundantes líquidos, por lo que se recomendó al paciente una dieta hipercalórica e hiperproteica.

Después de 18 sesiones del tratamiento, el paciente mostró una notable mejoría en las condiciones generales de su salud. Al finalizar el tratamiento, se aplicó el estudio de análisis clínicos cuyos valores se compararon con los del inicio (tabla 1). Como resultado, se logró disminuir hasta nivel no detectable la carga viral y se incrementaron los niveles de leucocitos totales, linfocitos y la proporción de CD4/CD8. Es importante destacar, que en esta enfermedad, se evalúa la efectividad de un medicamento o tratamiento, o si éste baja la carga viral. Se considera la carga viral plasmática suprimida cuando existen confirmadas menos de 40 copias virales/ml, resultado logrado

**Tabla 1.** Comparación de resultados de los estudios clínicos.

Parámetros	Inicio del tratamiento	Final del tratamiento	Referencia
<b>Carga viral/ml</b>	5304 copias/ml	<40 copias/ml	<40 copias/ml
<b>CD4</b>	240	494	410-1590 cel/µl
<b>CD8</b>	523	931	190-1140 cel/µl
<b>CD4/CD8</b>	0,46	0,53	1,3 - 1,7
<b>Leucocitos/mm<sup>3</sup></b>	3.800	4.020	4.000 14.000
<b>Linfocitos</b>	1.100	2.054	500-5.000

por el tratamiento coadyuvante con el ozono. La mayoría de los ensayos clínicos de cambio de TAR han incluido pacientes que habían mantenido este nivel de supresión vírica durante al menos 6 meses, por lo que sus resultados son aplicables preferentemente a pacientes con un tiempo de supresión similar. Como norma general, cuanto más prolongado sea el período de supresión vírica, es menos probable que el cambio de TAR se asocie a un fracaso. En nuestro paciente, se logró durante el tratamiento la disminución de carga viral a niveles no detectables.

## Conclusiones

Con este caso, la ozonoterapia abre una futura perspectiva en la terapia coadyuvante en el tratamiento de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y responde a la búsqueda de alternativas para pacientes con resistencia a los tratamientos antirretrovirales que se ofertan en el cuadro básico de salud y quienes definitivamente no responden a los medicamentos que en principio se les suministran como parte de su manejo<sup>19</sup>.

## Declaración de conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses en esta publicación.

## Referencias

1. González R, Romay Ch, Díaz-Llera S. Estudios sobre genotoxicidad del ozono. *Rev Cubana Invest Bioméd* 2004; 23(3): jul.-sep.
2. Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med* 1995;19: 935-41.
3. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 2000; 486: 10-3.
4. Bocci V, Aldinucci C, Bianchi L. The use of hydrogen peroxide as a medical drug. *Riv Ital Ossigeno Ozonoterapia* 2005; 4: 30-9.
5. Sagai M, Bocci V. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Medical Gas Research* 2011; 1(29): 1-18.
6. Méndez Pérez NI, Menéndez Cepero S, Rivero Wong J. Ozonoterapia en SIDA. *Rev Cubana Invest Bioméd* 2005; 24(1): ene.-mar.
7. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res* 2006; 37: 425-35.
8. Calunga JL, Zamora ZB, Borrego A, del Río S, Barber E, Menéndez S, Hernández F, Montero T, Taboada D. Ozone therapy on rats submitted to subtotal nephrectomy: role of antioxidant system. *Mediators Inflamm* 2005; 221-7.
9. Bocci V. The case for oxygen-ozone therapy. *Br J Biomed Sci* 2007; 64: 44-49.
10. Guven A, Gundogdu G, Sadir S, Topal T, Erdogan E, Korkmaz A, Surer I, Ozturk H. The efficacy of ozone therapy in experimental caustic esophageal burn. *Journal of Pediatric Surgery* 2008; 43: 1679-84.
11. Bocci VA. Why Orthodox Medicine Has Not Yet Taken Advantage of Ozone Therapy. *Arch Med Res* 2008; 39: 259-60.
12. Zamora ZB, Borrego A, Lopez OY, Delgado R, González R, Menéndez S, Hernández F, Schulz S. Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF-alpha release and antioxidant-prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. *Mediators Inflamm* 2005; 16-22.
13. Gómez Padrón T, Ceiro Caveda J, Castillo Ferrer A, Céspedes García ME. Polineuropatía en una persona viviendo con VIH-SIDA. *MEDISAN* 2008; 12(2).
14. Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sc, Biol and Medicine* 2011; 2(1): 66-70.
15. Schwartz A, Martínez-Sánchez G. La Ozonoterapia y su fundamentación científica. *Revista Española de Ozonoterapia*. 2012; 2(1): 163-98.
16. Méndez Pérez NI, Menéndez Cepero S, Rivero Wong J. Ozonoterapia en SIDA. *Rev Cubana Invest Biomed* 2005; 24(1): 69-71.
17. Bocci V, Zanardi I, Travagli V. Ozonation of human HIV-infected plasmas for producing a global vaccine How HIV-patients may help fight the HIV pandemic. *Virulence* 2010; 1(3): 215-7.
18. Re L, Mawsouf MN, Menéndez S, León OS, Sánchez GM, Hernández F. Ozone Therapy: Clinical and Basic Evidence of Its Therapeutic Potential. *Archives of Medical Research* 2008; 39: 17-26.
19. de Oliveira e Silva AC, Reis RK, Nogueira JA, Gir E. Calidad de vida, características clínicas y adhesión al tratamiento de personas viviendo con VIH/Sida. *Rev Latino-Americ Enfermagem* 2014; 22(6): 994-1000.

Recibido: 11 diciembre 2017

Aprobado: 20 enero 2018

## REVIEW / ARTÍCULO DE REVISIÓN

## Cytokines in the physiopathology of depression

### Citoquinas en la fisiopatología de la depresión

María Belén Paredes, María Eugenia Sulen

DOI. 10.21931/RB/ 2018.03.01.13

552

**ABSTRACT:** This paper presents a bibliographical review on the relevance of the possible role of cytokines in depression. There is a consideration of the existing approaches to detection and diagnosis of depression; they are classified according to different criteria such as design methodologies and applications. Although the etiology of depression is still an issue, the focus of this paper is to highlight the various studies regarding the interactions of the immune system and brain activity linked to depression. These interactions are particularly important when trying to find a correlation between proinflammatory cytokines (such as IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$ ) and depression. This includes a brief comparison of results obtained by different studies.

**Keywords:** depression, cytokines, inflammation, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6

**ABSTRACT:** Este artículo presenta una revisión bibliográfica sobre la relevancia del posible rol de las citoquinas en la depresión. Se tienen en cuenta los enfoques existentes para la detección y el diagnóstico de la depresión, estos han sido clasificados según diferentes criterios, como las metodologías de diseño y las aplicaciones. Aunque la etiología de la depresión sigue siendo un problema, el objetivo de este documento es mostrar los diferentes estudios sobre las interacciones del sistema inmune y la actividad cerebral relacionada con la depresión. Estas interacciones son particularmente importantes cuando se trata de encontrar una correlación entre las citoquinas proinflamatorias (como IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y la depresión. También se incluye una breve comparación de los resultados obtenidos en diferentes estudios.

**Palabras clave:** depresión, citoquinas, inflamación, TNF-  $\alpha$ , IL-1, IL-6

### Introduction

Depression is a mental health disorder characterized by a group of affective, cognitive and somatic symptoms<sup>1</sup>. Depression boards a broad spectrum of clinical presentations<sup>2</sup>, for this reason, depressive disorders are classified into three main subclasses: Major Depressive Disorder, Dysthymic Disorder and Depressive Disorder NOS (No Otherwise Specified). Each of them is characterized by the presence to greater or lesser degree of different features such as psychotic, catatonic, atypical and chronic<sup>3</sup>. The fourth version of the Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV) is used to diagnose depression<sup>4</sup>, and tests like the Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) and the Montgomery-Asberg Depression Rating Scale (MADRS) are used in several studies in order to rate depressive symptoms to determine the severity of depression<sup>5,6</sup>. Cognitive and sleep disturbances, fatigue, appetite suppression and depressed mood (sickness behaviour) are recognized as the most common symptoms of this disorder<sup>2</sup>. However, to determine the etiology and physiopathology of depression is still an issue because of its heterogeneity and the fact that depression appears concomitantly with many other diseases such as diabetes, rheumatoid arthritis and coronary heart disease<sup>2,3,7</sup>.

Major depressive disorder (MDD), the most severe in the classification of depressive disorders, is considered a major public health concern with 4% of the adult population presenting active symptoms<sup>8-10</sup>. It is associated with social dysfunction, which affects everyday life activities, increased risk of substance abuse, obesity, and suicide<sup>8,11,12</sup>. Furthermore, 13 % of people in the USA and 27% of people in Europe have episodes of major depression at least once in their life<sup>2</sup>.

Currently, there are several studies regarding the interactions between the immune system and the brain activity focused on finding a more accurate representation of depression physiopathology. In particular, there is an increased interest in the consequences of inflammation in depression and the role of proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$ . The consideration of a new approach regarding inflammation is based on the fact that illnesses promoting inflammatory responses are associated with higher rates of depression, the administration of cytokines induces depressive episodes in non-psychiatric patients, the therapeutic administration of cytokines has led to depression in up to 50% of the patients, and that cytokines induce behaviors that are commonly present as symptoms of depression<sup>13-20</sup>.

The study aims to review the existing information about the relevance of the possible role of cytokines in depression and the underlying mechanisms.

### Cytokines

Cytokines are large polypeptide regulatory mediator proteins secreted by white blood cells and other cells in the body. They play a role in the immune system specifically in inflammatory responses, the regulation of growth, differentiation, and function of cells. The most common classification of cytokines is into families of interleukins, tumor necrosis factors (TNF), interferons (INF), chemokines, haematopoietins and colony stimulating factors (CSF)<sup>21</sup>.

Interleukin-1 (IL-1) is the prototypic proinflammatory cytokine. It appears in two forms: IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . It functions as an immunoadjuvant as it is primarily under immune system control and it is highly inflammatory. The lea-

<sup>1</sup> Yachay Tech University, Ciudad del Conocimiento Yachay, Urcuquí, Imbabura, Ecuador 100119.

ding producers of IL-1 in the body are monocytes in the blood and macrophages residing in tissues in the body. Many viruses, fungi, bacteria, spirochetes, as well as other infectious agents such as urate, asbestos, silica, numerous cytokines (IL-1, IL-2, TNF, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , macrophage-colony stimulating factor, transforming growth factor $\beta$ ) among many other chemicals induce IL-1 production. Also, surgery, trauma, tissue damage, malignant cells, organ dysfunction and dying tissue trigger IL-1 release. As we can see, there is no secretion of cytokines unless the immune system is stimulated by either a biological or a psychological danger<sup>3,22</sup>.

Tumor necrosis factor (TNF) is a broad-spectrum (pleiotropic) cytokine. It has two forms, TNF alpha made by monocytes and macrophages, and TNF beta which is made by lymphocytes.

IL-1 triggers cells to make TNF and TNF induces cells to produce IL-1. When they work together, they have more powerful effects than each one working alone. TNF causes tumor cell necrosis and apoptosis. It has a significant role regulating morphogenesis, the sleep-wake cycle in lymph node follicle and germinal center formation as well along with host defense against bacterial and viral infection. TNF is a crucial mediator of both acute and chronic systematic inflammatory reactions. It not only induces its secretion, but it also stimulates the production of other inflammatory cytokines and chemokines. TNF has been the center of study for its roles in normal physiology, acute inflammation, chronic inflammation, autoimmune disease and cancer-related inflammation<sup>3,23</sup>. TNF- $\alpha$  has been hypothesized as a potential modulator of the serotonin transporter (SERT or 5-HTT), consequently 5-HT uptake, and brain availability<sup>24</sup>.

Interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine, which are primary in host defense thanks to its wide range of immune and hematopoietic activities. The production of IL-6 occurs at the site of inflammation. IL-6 also stimulates the production of acute phase proteins in response to varied stimuli. It is involved in many proliferative, differentiative, and maturation processes depending on the nature of the target cell. The overexpression of IL-6 has been related to pathology of countless diseases that include multiple myeloma, rheumatoid arthritis, Castleman's disease, psoriasis, and post-menopausal osteoporosis<sup>8,25,26</sup>.

### Relationship between serotonin, tryptophan, and cytokines

One of the theories that explain the causes of depressive disorders is the monoamine theory that has been widely used to produce antidepressant drugs to correct the shortage of monoaminergic neurotransmission in patients with this diagnosis. Serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT) is a monoamine neurotransmitter biochemically derived from the essential amino acid, tryptophan. The action of serotonin is through membrane receptors in both central and peripheral nervous systems as in non-neuronal tissues such as the gastrointestinal and endocrine systems<sup>27</sup>. Reduced concentrations of serotonin in the synaptic cleft and increase of reuptake by serotonin transporters are described as the main factors that contribute to depression. This is because evidence of alleviation of depressive symptoms using drug treatments that either increase the concentration of serotonin or inhibit its reuptake is available<sup>28</sup>. Furthermore, alterations in SERT expression and activity associated with variations in the human SERT gene are linked to mental illness<sup>29</sup>. In addition, related to serotonin metabolism, patients with major depression show low plasma levels of tryptophan, which in turn reduces the availability of

the precursor for 5-HT synthesis, decreasing the levels of serotonin in the brain<sup>30</sup>. Moreover, the inflammatory approach to describe depressive disorders pictures many mechanisms by which proinflammatory cytokines reach the brain and affect monoamine metabolism<sup>29,31</sup>.

Cytokine signals are able to reach the brain through humoral, neural and cellular pathways. Cytokines are relatively large proteins (ranging from 6–70 kDa) making them unable to pass through the blood-brain barrier (BBB)<sup>31</sup>. The presumptive non-exclusive mechanisms of how cytokines access the central nervous system (CNS) are: 1.) Direct crossing of cytokines into the CNS, this occurs in the periventricular organs, where the blood-brain barrier (BBB) is physiologically absent, less restrictive (e.g. organum vasculosum laminae terminalis (OVL) and the median eminence) or when it becomes leaky, the integrity of the BBB may be impaired due to traumas or certain pathological conditions resulting in increased access of various inflammatory cells and molecular constituents, including cytokines, to the brain, 2.) Migration of cytokines by means of paracellular and transmembranous diffusion or active transport via saturable cytokine-specific molecules on brain endothelium, 3.) Activation of endothelial cells, responsible for the subsequent release of second messengers like nitric oxide (NO) and prostaglandins (PGs) within the brain parenchyma, 4.) Transmission of cytokine signals via afferent nerve fibers, such as the vagus nerve, 5.) Entry into the brain parenchyma of peripherally activated monocytes<sup>14,32,33</sup>.

Cytokines may induce depressive symptoms by down-regulating the synthesis of serotonin. This might be because of the relationship between the immune system and the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). This enzyme is expressed in the neuroglia such as microglia, astrocytes, and neurons as well as in macrophages and dendritic cells. This enzyme is highly inducible by some cytokines including IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-6 through activation of a number of inflammatory signal transduction pathways these being signal transducer and activator of transcription 1a (STAT1a), interferon regulatory factor (IRF)-1, NF- $\kappa$ B and p38 MAPK<sup>14,34</sup>. IDO switches the metabolism of tryptophan (TRP) toward the synthesis of kynurenine and quinolinic acid, to the detriment of serotonin synthesis (Figure 1). IDO is involved in depression not only because of its effects on serotonin biosynthesis but also because of its putative contributions to excitotoxicity and oxidative stress<sup>31,35,36</sup>. IDO's activity is augmented by the chronic activation of the immune system; this includes coronary heart disease, immunotherapy, obesity, acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), atherosclerosis, and rheumatoid arthritis<sup>37</sup>.

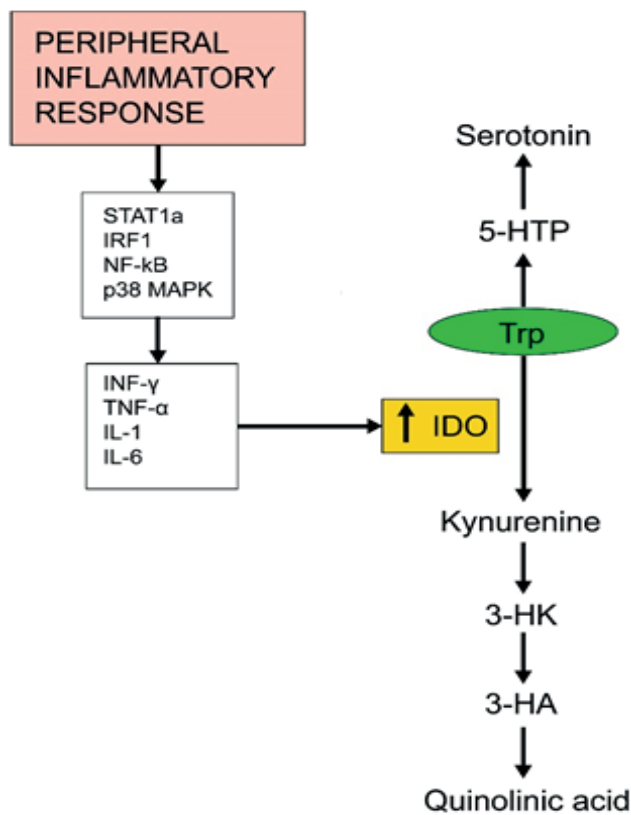
### Conditions that support the inflammatory hypothesis in the physiopathology of depression

#### Stress and depression

Stress is common in everyday life; however, traumatic stress can be a relevant factor for CNS illnesses as well as peripheral organ systems<sup>38</sup>. Also, chronic stress initiates changes in the immune system and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and the immune system which in turn trigger depression<sup>39</sup>. In addition to immune stimuli, and physical stress such as infection, chronic inflammation, and tissue injury, exposure to psychological stressors can also induce cytokine expression in the brain<sup>33,36</sup>. One of the major environmental factors that may interact with cytokines and genetic predisposition to major depression is stress<sup>31</sup>. Physical and psychological stressors can activate immune cells in both the periphery and CNS to



**Figura 1.** Induction of IDO by cytokines switches the metabolism of tryptophan toward the synthesis of kynurenine and quinolinic acid, to the detriment of serotonin production



release inflammatory cytokines that lead to neurotransmitter changes and behavioral alterations. The immune system is able to detect danger signals by the release of danger associated molecular patterns (DAMPs) through a process known as “sterile inflammation.” DAMPs may serve as a significant bond between stress and inflammatory activity. It is speculated that DAMPs are released during stress. These may generate an immune response through the NLRP3 inflammasome, which is a multiprotein complex involved in the processing of IL-1 $\beta$ . DAMPs stimulate the inflammasome when lipopolysaccharide (LPS) are present, activating caspase-1, which cleaves the immature precursor of interleukin IL-1 $\beta$  and IL-18 into their mature releasable forms. This increase in IL-1 $\beta$  release, allowing the release of other inflammatory cytokines that are released during stress<sup>40</sup>.

### Hippocampus and depression

Cytokines, like IL-6 and TNF- $\alpha$ , are identified as having both neurodegenerative and neuroprotective activities relevant to neuropsychiatric disorders when presented in non-physiological and physiological concentrations, respectively<sup>41</sup>. Under stress conditions that induce cytokine production in the brain, the hippocampus (HC) suffers structural changes<sup>42,43</sup> that may be associated with the atrophy of the HC in stress-linked depression. Patients with diagnosed MDD show a reduction of hippocampal volume (4-6% smaller) in the left and right HC<sup>44</sup>. Evidence of the neurodegenerative activity of IL-6 relies on the association between high IL-6 plasma levels with a reduction in the volume of the HC. However, there is also evidence for the neuroprotective role of this cytokine. High levels of IL-6 are also present when there is an increase of TNF and IL-1 $\beta$  concentrations, suggesting a role of downregulation of neuro-

inflammation. In addition, healthy subjects that carry the genetic variant *rs1800795* of IL-6 show larger volumes on the right side of the hippocampus, which highlights the possible neuroprotective role of IL-6<sup>41</sup>. In the other hand, TNF- $\alpha$  may be necessary in brain development and as a modulator of synaptic plasticity when present in low concentrations. Synaptic plasticity is a fundamental mechanism of neuronal adaptation that becomes modified in depression, models of stress in animals and other conditions that alter mood. Increased levels of proinflammatory cytokines, in particular, TNF- $\alpha$  and IL-1 are able to damage synaptic plasticity and cognition promoting the progression of depressive disorders. Patients diagnosed with MDD show large deficits in declarative memory and cognition, mental processes that rely on the ideal functioning of the hippocampus and medial temporal lobe<sup>45</sup>.

### Depression and other illnesses

High rates of depression are usually associated with diseases that involve upregulation of inflammatory processes<sup>37,46,47</sup>. Medical illnesses that enhance the appearance of inflammatory markers such as Alzheimer’s disease, MS, obesity, rheumatoid arthritis and gastrointestinal inflammation, promote the development of depression in patients suffering from these diseases at higher rates than in healthy patients<sup>33,40,48</sup>. Furthermore, treatments for conditions that include the use of proinflammatory agents such as interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) or IL-2 induce depression. This was proved in patients suffering from chronic infectious hepatitis C and cancer<sup>47,49,50</sup>. Cancer patients with depression show elevated levels of IL-6 compared to cancer patients without depression<sup>47,51</sup>. Cardiovascular diseases that are principally caused by atherosclerosis and the associated inflammation of arteries wall can promote the development of depression and vice versa. The use of anti-inflammatory medications (aspirin) to prevent cardiovascular events are associated with the reduction of the symptoms of depression. Exercise also downregulates TNF $\alpha$  and inflammation<sup>52,53</sup>. However, healthy patients presenting depression and no comorbidity show elevation of cytokines and its receptors in the CSF, so cytokine levels are not more strongly associated with somatic than psychological symptoms of depression<sup>49,54</sup>.

### Clinical Trials

The NCT00463580 study evaluated the effect of anti-inflammatory monoclonal antibodies in patients with treatment-resistant depression (TRD). It was a single site, parallel-group, randomized, double-blind controlled trial of infliximab versus placebo. Participants were patients with major depression, non-respondent to antidepressant therapies<sup>55</sup>. Infliximab is a monoclonal antibody TNF-alpha antagonist that suppresses the body’s response to this cytokine. This study aimed to test the efficacy of infliximab (Remicade®) in reducing symptoms of depression compared to the effects of placebo. High sensitivity c-reactive protein (hs-CRP), TNF-alpha, sTNFR1, and sTNFR2 were considered as biomarkers of inflammation and measured at baseline. The results showed that inhibition of TNF-alpha activity could not be regarded as a valid therapeutic strategy for TRD because infliximab did not show improvements in depressive symptoms. However, subjects with an elevated baseline of hs-CRP (hs-CRP>5mg/L) responded better to infliximab, showing a correlation between high inflammation and subsequent response to treatment. Of note, high levels of CRP are due to the increase of IL-6 concentration levels in plasma during inflammation<sup>56</sup>. Other non-randomised and/or non-placebo trials exhibited improvement of depressive

symptoms after treatment with TNF-alpha inhibitors including adalimumab<sup>57,58</sup> and etanercept<sup>59</sup>; nonetheless, these studies evaluated depressive symptoms comorbid with Crohn's disease, psoriasis, and psoriasis and psoriatic arthritis, respectively.

Moreover, several clinical trials have demonstrated the neurocognitive processes between proinflammatory cytokines and depression. For this, they used endotoxin, which is a typhoid vaccination that increases cytokine expression, therefore, inducing a depressed mood in healthy patients. For one of the experimentations, neuroimaging was used to evaluate the levels of IL-6 via a whole-brain regression analysis two hours post injection. Results showed that social exclusion leads to depressed mood with a significant difference between males and females, being higher in women<sup>60</sup>. Another trial using this same drug evaluated the association of the neural activity with anhedonia (a symptom of depression). Cytokine levels were measured through blood draws every hour to measure plasma levels, and neural activity was recorded using SPM'5. Results showed that there is a significant relationship between inflammatory activity and depressed mood<sup>61</sup>.

## Conclusion

Throughout this review, we overviewed the role of cytokines in the immune system, its relationship with serotonin and tryptophan and the conditions that support the inflammatory hypothesis in the physiopathology of depression. Depression is without a doubt a complex disorder and understanding the roles of different processes that contribute to this disorder is a first step to achieve adequate treatment. The importance of this study lies in raising the possibility of finding psychotropic drugs that have a central anti-inflammatory action and that could provide a new generation of antidepressants.

## References

- Alberdi J, Taboada O, Castro C, Vázquez C. Depresión. *Guías Clínicas*. 2006;6:1-6.
- Sharpley C, Agnew L. Cytokines and depression: findings, issues, and treatment
- Smith R. Cytokines and Depression: How Your Immune System Causes Depression. [Internet]. 1997. [cited 2017 Nov 5] available from: <http://www.cytokines-and-depression.com/>
- Köhler O, Benros M, Nordentoft M, Farkouh M, Iyengar R, Mors O, Krogh J. Effect of Anti-inflammatory Treatment on Depression, Depressive Symptoms, and Adverse Effects. *JAMA Psychiatry*. 2014;71(12):1381-1391.
- Abbasi S, Hosseini F, Modabbernia A, Ashrafi M, Akhondzadeh S. Effect of celecoxib add-on treatment on symptoms and serum IL-6 concentrations in patients with major depressive disorder: Randomized double-blind placebo-controlled study. *J Affect Disord*. 2012;141(2-3):308-314.
- Sowa-Kućma M, Styczeń K, Siwek M, Misztak P, Nowak R, Dudek D, Rybakowski J, Nowak G, Maes M. Lipid Peroxidation and Immune Biomarkers Are Associated with Major Depression and Its Phenotypes, Including Treatment-Resistant Depression and Melancholia. *Neurotox Res*. 2017.
- Young J, Bruno D, Pomara N. A review of the relationship between proinflammatory cytokines and major depressive disorder. *J Affect Disord*. 2014;169:15-20.
- Gabbay V, Klein R, Alonso C, Babb J, Nishawala M, De Jesus G. et al. Immune system dysregulation in adolescent major depressive disorder. *J Affect Disord*. 2009;115(1-2): 177-182.
- Gabbay V, Klein R, Guttman L, Babb J, Alonso C, Nishawala M et al. A Preliminary Study of Cytokines in Suicidal and Nonsuicidal Adolescents with Major Depression. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2009;19(4):423-430.
- Setiawan E, Wilson A, Mizrahi R, Rusjan P, Miller L, Rajkowska G et al. Increased Translocator Protein Distribution Volume, A Marker of Neuroinflammation, in the Brain During Major Depressive Episodes. *JAMA Psychiatry*. 2015;72(3):268-275.
- Judd L, Paulus M, Wells K, Rapaport M. Socioeconomic burden of subsyndromal depressive symptoms and major depression in a sample of the general population. *Am J Psychiatry*. 1996;153(11):1411-1417.
- Kiecolt-Glaser J, Derry H, Fagundes C. Inflammation: Depression Fans the Flames and Feasts on the Heat. *Am J Psychiatry*. 2015;172(11):1075-1091.
- Bai Y, Chiou W, Su T, Li C, Chen M. Pro-inflammatory cytokine associated with somatic and pain symptoms in depression. *J Affect Disord*. 2014;155:28-34.
- Capuron L, Miller A. Immune system to brain signalling: Neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol Ther*. 2011;130(2):226-238.
- Dantzer R. Cytokine-Induced Sickness Behavior: Where Do We Stand? *Brain Behav Immun*. 2001;15(1):7-24.
- Dantzer R, Wollman E, Vitkovic L, Yirmiya R. Cytokines and depression: fortuitous or causative association? *Mol Psychiatry*. 1999;4(4):328-332.
- Dunjic-Kostic B, Ivkovic M, Radonjic N, Petronijevic N, Pantovic M, Damjanovic A, Jasovic-Gasic M. Melancholic and atypical major depression — Connection between cytokines, psychopathology and treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013;43:1-6.
- Pavón L, Sandoval-López G, Hernández M, Loría F, Estrada I, Pérez M et al. Th2 cytokine response in Major Depressive Disorder patients before treatment. *J Neuroimmunol*. 2006;172(1-2): 156-165.
- Raison C, Capuron L, Miller A. Cytokines sing the blues: inflammation and the
- Xie Z, Wang X, Xu N, Wang J, Pan W, Tang X, Yang J. Alterations in the inflammatory cytokines and brain-derived neurotrophic factor contribute to depression-like phenotype after spared nerve injury: improvement by ketamine. *Sci Rep*. 2017;7(1):3124.
- O'Brien S, Scott L, Dinan T. Cytokines: abnormalities in major depression and implications for pharmacological treatment. *Hum Psychopharmacol*. 2004;19(6):397-403.
- Dinarello C. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997;8(4):253-265.
- Chu W. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett*. 2012;328(2):222-225.
- Feltes P, Doorduyn J, Klein H., Juárez-Orozco L, Dierckx R, Moriguchi-Jeckel C, de Vries E. Anti-inflammatory treatment for major depressive disorder: implications for patients with an elevated immune profile and non-responders to standard antidepressant therapy. *J Psychopharmacol*. 2017;31(9):1149-1165.
- Simpson R, Hammercher A, Smith D, Mathews J, Ward L. Interleukin-6: Structure-function relationships. *Protein Sci*. 1997;6(5):929-955.
- Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(Suppl 2):S3.
- Hannon J, Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res*. 2008;195(1): 198-213.
- Dantzer R, O'Connor J, Lawson M, Kelley K. Inflammation-associated depression: From serotonin to kynurenine. *Psychoneuroendocrinology*. 2011;36(3):426-436.
- Zhu C, Blakely R, Hewlett W. The Proinflammatory Cytokines Interleukin-1beta and Tumor Necrosis Factor-Alpha Activate Serotonin Transporters. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(10):2121-2131.
- Baranyi A, Amouzadeh-Ghadikolai O, von Lewinski D, Breitenecker R, Rothenhäusler H, Robier C et al. Revisiting the tryptophan-serotonin deficiency and the inflammatory hypotheses of major depression in a biopsychosocial approach. *PeerJ*. 5:e3968
- Haroon E, Raison C, Miller A. Psychoneuroimmunology Meets Neuropsychopharmacology: Translational Implications of the Im-

- pact of Inflammation on Behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(1):137-162.
32. Lichtblau N, Schmidt F, Schumann R, Kirkby K, Himmerich H. Cytokines as biomarkers in depressive disorder: Current standing and prospects. *Int Rev Psychiatry*. 2013;25(5):592-603.
  33. Schiepers O, Wichers M, Maes M. Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005;29(2):201-217.
  34. Shelton R, Claiborne J, Sidoryk-Wegrzynowicz M, Reddy R, Aschner M, Lewis D, Mirnics K. Altered expression of genes involved in inflammation and apoptosis in frontal cortex in major depression. *Mol Psychiatry*. 2011;16(7):751-762.
  35. Loftis J, Huckans M, Morasco B. Neuroimmune mechanisms of cytokine-induced depression: Current theories and novel treatment strategies. *Neurobiol Dis*. 2010;37(3):519-533.
  36. apuron L, Dantzer R. Cytokines and depression: The need for a new paradigm. *Brain Behav Immun*. 2003;17 (Suppl 1):S119-124.
  37. Dantzer R, O' Connor J, Freund G, Johnson R, Kelley K. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2008; 9(1): 46-56.
  38. Iwata M, Ota K, Duman R. The inflammasome: Pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. *Brain Behav Immun*. 2013;31:105-114.
  39. Leonard B. The Concept of Depression as a Dysfunction of the Immune System. *Curr Immunol Rev*. 2010;6(3): 205-212.
  40. Felger J, Lotrich F. Inflammatory cytokines in depression: Neurobiological mechanisms and therapeutic implications. *Neuroscience*. 2013;246:199-229.
  41. Baune B, Konrad C, Grotegerd D, Suslow T, Birosova E, Ohrmann P et al. Interleukin-6 gene (IL-6): a possible role in brain morphology in the healthy adult brain. *J Neuroinflammation*. 2012;9:125.
  42. Malberg J, Duman R. Cell Proliferation in Adult Hippocampus is Decreased by Inescapable Stress: Reversal by Fluoxetine Treatment. *Neuropsychopharmacology*. 2003;28(9):1562-1571.
  43. Miller A, Raison C. Are Anti-inflammatory Therapies Viable Treatments for Psychiatric Disorders? Where the Rubber Meets the Road. *JAMA Psychiatry*. 2015;72(6):527-528.
  44. Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen G. Lower Hippocampal Volume in Patients Suffering From Depression: A Meta-Analysis. *Am J Psychiatry*. 2004;161(4):598-607.
  45. Khairova R, Machado-Vieira R, Du J, Manji H. A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009;12(4):561-578.
  46. Farooq R, Asghar K, Kanwal S, Zulqernain A. Role of inflammatory cytokines in depression: Focus on interleukin-1. *Biomed Rep*. 2017;6(1):15-20.
  47. O'Connor M, Irwin M, Sheldon J, Kwan L, Ganz P. Pro-inflammatory cytokines and depression in a familial cancer registry. *Psychooncology*. 2007;16(5):499-501.
  48. Yirmiya R, Pollak Y, Morag M, Reichenberg A, Barak O, Avitsur R, Pollmächer T. Illness, Cytokines and Depression. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;917:478-487.
  49. Miller A, Maletic V, Raison C. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biol Psychiatry*. 2009;65(9):732-741.
  50. Pasic J, Levy W, Sullivan M. Cytokines in Depression and Heart Failure. *Psychosom Med*. 2003;65(2):181-193.
  51. Breitbart W, Rosenfeld B, Tobias K, Pessin H, Ku G. Y, Yuan J, Wolchok J. Depression, cytokines, and pancreatic cancer. *Psychooncology*. 2014;23(3):339-345.
  52. Funk J, Gohlke J, Kraft A, McPherson C, Collins J, Jean Harry G. Voluntary exercise protects hippocampal neurons from trimethyltin injury: Possible role of interleukin-6 to modulate tumor necrosis factor receptor-mediated neurotoxicity. *Brain Behav Immun*. 2011;25(6):1063-1077. Hiles S, Baker A, Malmanche T, Mcevoy M, Boyle M, Attia J. The role of inflammatory markers in explaining the association between depression and cardiovascular hospitalisations. *J Behav Med*. 2015;38(4):609-619.
  54. Einvik G, Vistnes M, Hrubos-Strøm H, Randby A, Namtvedt S, Nordhus I et al. Circulating cytokine concentrations are not associated with major depressive disorder in a community-based cohort. *Gen Hosp Psychiatry*. 2012;34(3):262-267.
  55. Raison CL, Rutherford RE, Woolwine BJ, Shuo C, Schettler P, Drake DF et al. A randomized controlled trial of the tumor necrosis factor antagonist infliximab for treatment-resistant depression: the role of baseline inflammatory biomarkers. *JAMA Psychiatry* 2013;70(1):31-41.
  56. Seo HS. The Role and Clinical Significance of High-Sensitivity C-Reactive Protein in Cardiovascular Disease. *Korean Circ J*. 2012;42(3):151-153.
  57. Loftus EV, Feagan BG, Colombel JF, Rubin DT, Wu EQ, Yu AP et al. Effects of adalimumab maintenance therapy on health-related quality of life of patients with Crohn's disease: patient-reported outcomes of the CHARM trial. *Am J Gastroenterol* 2008;103(12): 3132-3141.
  58. Guh D, Papp K, Lynde C, Bansback N, Zhang W, Qian H et al. Impact of adalimumab on quality of life and depression in psoriasis patients: results from PRIDE. *Value Health* 2010; 132010: A148.
  59. Gniadecki R, Robertson D, Molta CT, Freundlich B, Pedersen R, Li W et al. Self-reported health outcomes in patients with psoriasis and psoriatic arthritis randomized to two etanercept regimens. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(11):1436-1443.
  60. Eisenberger NI, Inagaki TK, Rameson LT, Mashal NM, Irwin MR. An fMRI study of cytokine-induced depressed mood and social pain: The role of sex differences. *NeuroImage*. 2009;47(3):881-90.
  61. Eisenberger NI, Berkman ET, Inagaki TK, Rameson LT, Mashal NM, Irwin MR. Inflammation-Induced Anhedonia: Endotoxin Reduces Ventral Striatum Responses to Reward. *Biological Psychiatry*. 2010;68(8):748-54.

Received: 20 December 2017

Approved: 2 February 2018

## NEWS AND VIEWS / NOTICIAS Y OPINIONES

# Current methods of breast cancer diagnosis Métodos actuales en el diagnóstico del cáncer de mama

Keila Gómez, Juan Carlos Laglaguano, Raúl Rodríguez

DOI. 10.21931/RB/2018.03.01.14

**ABSTRACT:** Breast cancer is the most frequent cancer among women, and represents the second highest number of deaths around the world, it's difficult to diagnose because there are different types of breast cancer. The new methods for the detection of breast cancer are very promising because they guarantee that the patients received the specific kind of treatment. At present, there are breast cancer detection techniques which are very expensive, traditional and complicated, which leads us to the need to develop easy-to-use and more sensitive devices. In this review, we will analyze more recent methods of breast cancer diagnosis such as molecular signatures, micro-RNA, and bioinformatic methods.

**Keywords:** Breast cancer, diagnostic methods

**RESUMEN:** El cáncer de mama es el más frecuente entre las mujeres y representa el segundo mayor número de muertes en todo el mundo, es difícil ser diagnosticado porque hay diferentes tipos de cáncer de mama. Los nuevos métodos para la detección de cáncer de mama son muy prometedores porque garantiza que los pacientes recibieron el tipo adecuado de tratamiento. En la actualidad, existen técnicas de detección de cáncer de mama, que son muy costosas, tradicionales y complicadas, lo que nos lleva a la necesidad de desarrollar dispositivos más fáciles de usar y más sensibles. En esta revisión, analizaremos los métodos de diagnóstico de cáncer de mama más recientemente, como las firmas moleculares, el microARN y los métodos bioinformáticos.

**Palabras claves:** Cáncer de mama, métodos diagnósticos.

## Introduction

Breast cancer is the most common cancer diagnosed in women around the world; Ecuador is not an exception (Tab. 1). Cancer starts when breast cells begin to grow in an uncontrolled manner way. To understand breast cancer, we must know the basic anatomical structure of the breast. Each breast is composed of lobules, lobes, and bulbs that are connected by ducts. Lobs are divided into smaller structures called lobules that end in tiny bulbs that can produce milk. Breast cancer is classified based on the anatomical structure and according to this classification, the most common types of breast cancer are the ductal carcinoma and invasive lobular carcinoma<sup>1</sup>. Differentiating all breast tumor types is relevant in the clinical treatment case to guarantee that patients received the most appropriate kind of therapy<sup>2</sup>. Currently, there are breast cancer detection techniques, which are very expensive, traditional and complicated, which leads us to the need to develop innovative, determined and ultrasensitive devices<sup>3</sup>. In this review, we will conduct a study on the new methods of breast cancer diagnosis currently in use such as the use of molecular signatures, biosensors, micro RNA, and bioinformatics methods.

## Molecular signatures

The acceptance of molecular profiles of DNA, RNA, and proteins reveals significant differences in fundamental biology, and this begins to have an impact on patients who are handling this technique. Diverse bioinformatics devices have been refined using DNA or RNA-based signatures to classify the illness into biologically and clinically essential subgroups<sup>2</sup>. A characterization of cancer will obtain somatic mutations in the

tumor genome, which include base substitutions, insertions, and deletions, changes in the number of copies and structural rearrangements. Nowadays, some mutations accumulate in the cell lineage, and individual or collective work gives a significant selective advantage to the tumor cell. Its form of distribution serves as a trace to discover underlying mutational processes that aid the development of the tumor<sup>4,5</sup>. A characterization of cancer is that it obtains somatic mutations in the tumor genome, which includes substitutions of bases, insertions, and deletions, changes in the number of copies and structural rearrangements<sup>6</sup>. A large number of classifiers are found which based on the number of copies for breast cancer<sup>7</sup>. These classifiers can be the use of random forest variants<sup>8</sup>, logistic regression and group loop<sup>9</sup>, fused support vector machine<sup>10</sup> and the union of functions that have supervision or not which use silhouette techniques to estimate clusters<sup>11</sup>. In the supervised as in the unsupervised FC, excellent performance found when ordering the CGH data of the tumor samples, due to the ability to exclude the unwanted correlation bias<sup>7</sup>. Also, to have an idea of the etiology of the tumor, substitution signatures and patterns of structural rearrangements give a more definite vision. A large number of studies of complete genomes of breast cancer<sup>12</sup> defined six reconditioning firms which were based on type and size of disposition, and also in the extension of the alteration in the whole genome (grouped or dispersed)<sup>2</sup>.

## Biomarkers

In recent years, research in the field of molecular biology has contributed to the improvement in the diagnosis of can-

<sup>1</sup> Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay Tech

cer. Tumor markers are biochemical indicators when a tumor is present; this incorporates cell surface antigens, cytoplasmic proteins, enzymes, and hormones. In clinical practice, the term is used to refer to molecules that are available in plasma, body fluids, solid tumors, circulating tumor cells, lymph nodes and bone marrow<sup>13</sup>. The technique of immunohistochemical detection of specific antigens of the cell cycle is used to evaluate the proliferative activity of cells<sup>14</sup>.

For example, Ki67 is located in the cell nucleus where it only binds to the perichromosomal layer in cells that divide and grow actively; this is used as a marker to determine cell proliferation. In consequence, changes in Ki67 expression in growing tumor cells compared to healthy cells can be used as an early predictor for treatment efficiency and can also be used as a prognostic factor for long-term outcomes in cancer patients<sup>15</sup>.

Salivary biomarkers are being used to characterize breast cancer, correlating total salivary sialic acid and breast cancer. The sialic acid found in the final residues of the carbohydrate chains are biologically necessary and essential for the functioning of the glycoconjugates. In patients who have cancer, these markers are altered. The increase of sialylation of the glycoconjugates of the cell surface is localized between the critical molecular changes associated with malignant transformation and cancer progression<sup>16</sup>. Studies have found higher levels of salivary sialic acid in patients who have breast cancer compared to the healthy control group<sup>17</sup>. Finally, the future of tumor biomarkers is promising, because they provide information on the biological behavior of the tumor and this is of great importance because they reduce the mortality of patients who have cancer.

### Micro-RNA

MicroRNA are small noncoding RNA molecules around of 18-25 nucleotides in length<sup>18</sup>. They regulate gene expression to repress or/and promote mRNA degradation<sup>19</sup>. miRNAs can control multiple critical pathways that are involved in physiological as well as pathological processes. The downregulation of miRNA genes could result from aberrant hypermethylation, as in the case of miR-9-1 gene in breast cancer<sup>20</sup>, or from histone deacetylation and tri-methylation, as in the case of miR-29 in B-cell lymphomas<sup>21</sup>. MiRNA is present in several biological fluids, among them breast milk<sup>22</sup>.

Breast cancer could be classified according to different parameters such as histology, immunopathology, mRNA expression profiling, and miRNA expression signature<sup>23</sup>. MiRNA signature can sub-classify breast cancer<sup>24</sup>, and can even determine new subtypes, as recently reported<sup>25</sup>. MiRNA is expressed in breast cancer, as manifest by microarray profiling of tumor and normal breast tissues<sup>26</sup>. Various studies reveal that diverse functions of the dysregulated miRNA in malignant breast transformation whereby they act as oncogenes (oncomiRNA) or as tumor suppressors. In breast cancer, miRNA has been shown to regulate cell cycle progression, apoptosis, angiogenesis, epithelial-mesenchymal transition, tumor microenvironment, migration, invasion, metastasis and drug resistance, as well as the differentiation and self-renewal of breast cancer stem cells<sup>27</sup>. For strength to endocrine treatments, the serum miRNA has the potential to serve as a biomarker of EBC.

### Diagnostic methods of microRNA in breast cancer

Studies carried out had shown that the miR-21 that is the most researched onco miRNAs in this malignant disease serves as a diagnostic biomarker for EBC<sup>28-34</sup>. The studies de-

tected miR-21 in breast tissues using experimental technology as microarray/sequencing/RT-qPCR followed by validation in serum and plasma<sup>33-35</sup>. Other studies were carried out in array panels on plasma samples followed by verification in plasma, and the technique that implemented was RT-qPCR<sup>32</sup> or started with RT-qPCR on tissues then direct serum RT-qPCR<sup>28</sup>. Signally, serum miR-21 exhibited higher sensitivity in EBC diagnosis than other conventional cancer markers, such as CA153 and CEA<sup>30</sup>. In another study with the same method, the miR-155 shown to upregulated in serum and tissues of breast cancer patients<sup>26,36-39</sup>.

MiR-12b and miR-145 were the first to be downregulated and miR-21 to be upregulated in BC tumors compared to normal breast tissues<sup>40-42</sup>, had used in ER $\alpha$  (estrogen receptor alpha) + BC diagnostic the MammaPrint, Oncotype DX and PAM50 gene arrays. One study of miRNA expression with current scores from Oncotype DX on 23 human BC tumors reported that in left of 7 family members reduced expression with high RS and high expression of miR-377-5p, miR-663b and miR 3648 associated with high RS scores.

Prognostic miRNAs for tumor versus regular class prediction were determined by using the tool support vector machine and prediction analysis of software microarrays, these algorithms used too for cross-validation. Another method of diagnostic is the Northern blotting analysis that were done in RNA sample (10 mg each) were electrophoresed on 15% acrylamide, 7 mol/L urea criterion precast gels and transferred onto Hybond-N+ membrane<sup>39</sup>. The Hybridization was done at a temperature of 37° C in 7 % SDS/0.2 mol/L Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (pH 7.0) for a time of sixteen hours. The membranes were washed at 42° C twice with two standard saline phosphate one mmol/L EDTA, and 0.1% SDS and again twice with 0.5 SSPE/0.1% SDS. The oligonucleotides used as probes are the complementary sequences of the mature miRNA, used to normalize expression levels. In the results the microarray analysis they carried out the study of the Northern blot of the differentially expressed miRNAs<sup>26</sup>. They analyzed the expression of miR-125b, miR-145, and miR-21 both in human breast cancers and in breast cancer cell line. Moreover, all Northern blots confirmed results obtained by the microarray analysis. The miRNAs: miR-10b, miR125b, miR-145, miR-21, and miR-155 were analyzed using three algorithms, miRanda, TargetScan, and PicTar, that are commonly used to predict human miRNA gene target.

### Bioinformatic methods

There are many data about breast cancer such as medical records, clinical data or biomedical images are collected and available on databases. Some of the famous databases about breast cancer are the Wisconsin Breast Cancer Database and ArrayExpress. Wisconsin Breast Cancer Database is renowned because it offers information of computed features of the breast cancer cells nuclei<sup>43</sup>. From digitized images, Wisconsin Breast Cancer Database offers an evaluation 32 features such as radius, texture, perimeter, area, smoothness, compactness, concavity, hollow points, symmetry fractal dimension and diagnosis (malignant or benignant) from digitized images of a fine-needle aspirate of a breast mass<sup>44</sup>. Another database is Array Express, that is a public repository for microarray data. Their databases not only contain data about cancer but also from functional genomics experiments of thousands of clinical studies, and provides these data for the reuse to the research community<sup>45</sup>.

Despite the existence of available data about breast cancer, there are no suitable methods to analyze the significant

amounts of data. It will be impossible for humans to process vast amounts of information so that computers have been fundamental for the development of science in general. Bioinformatics combines computer sciences, biological sciences, mathematics and engineering to process and interpret data. One of the most used fields of bioinformatics is artificial intelligence. In simple terms, artificial intelligence it would be defined as the use of a computer to simulate human intelligence and ability to learn<sup>46</sup>. Data mining and machine learning are two related artificial intelligence technologies; they can be related to each other. Machine Learning refers to the study, design, and development of the algorithms that give computers the capability to learn without being explicitly programmed<sup>47</sup>. Data Mining is the process that starting from apparently unstructured data tries to extract knowledge and interesting unknown patterns. During this process, the use of machine learning techniques is necessary for most of the data mining techniques.

Data mining is the automated or convenient extraction of information patterns from data stored in massive information repositories, or data streams<sup>47</sup>. The primary medical applications of data mining are patient phenotype cohorts<sup>48</sup>, pharmacovigilance<sup>49</sup>, clinical pathways<sup>50</sup>, healthcare process<sup>51</sup>, disease progression<sup>52</sup>, and deep learning for precision medicine and Human-computer interaction and knowledge discovery in dataset approach in biomedical informatics. Data mining techniques are based on training and testing the system regarding the characteristic or feature that have to be analyzed. The complexity of the data mining process depends on how extensive are the data to be examined and the number of elements to integrate into the mining process.

In the data mining is a multistep process<sup>53</sup>. The first step implies the collection, preprocessing, and normalization of data. Data is collected from heterogeneous sources and converted into homogenous. The second step is training and testing of the algorithms to obtain some meaningful information in an automatized way. The third step analyzes the processed data and represents it in a standardized format. Finally, the upshots of data mining progression are useful in the prediction, of for example, the presence or not of cancer breast cells or the type of breast cancer by the use of biomedical images<sup>54</sup> or analyzing DNA microarrays<sup>55</sup>. In general, data mining is used to test a hypothesis or to discover some new or hidden patterns<sup>53</sup>. Bioinformatic methods are fundamental to increase the accuracy of breast cancer diagnosis starting with clinical data.

## Conclusion

New methods of cancer diagnosis have the potential to improve the accuracy of diagnosis and avoidance invasive techniques that are traumatic for the patients.

## References

- Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: How special are they? *Mol Oncol*. 2010 Jun 1;4(3):192–208.
- Lal S, McCart Reed AE, de Luca XM, Simpson PT. Corrigendum to "Molecular signatures in breast cancer" [Methods 131 (2017) 135–146]. *Methods* [Internet]. [cited 2017 Nov 1]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202318300227>
- Mittal S, Kaur H, Gautam N, Mantha AK. Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. *Biosens Bioelectron*. 2017 Feb 15;88:217–31.
- Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013 Aug 22;500(7463):415–21.
- Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, Van Loo P, Greenman CD, Raine K, et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell*. 2012 May 25;149(5):979–93.
- Hicks J, Krasnitz A, Lakshmi B, Navin NE, Riggs M, Leibu E, et al. Novel patterns of genome rearrangement and their association with survival in breast cancer. *Genome Res*. 2006 Dec;16(12):1465–79.
- Tolosi L, Lengauer T. Classification with correlated features: unreliability of feature ranking and solutions. *Bioinforma Oxf Engl*. 2011 Jul 15;27(14):1986–94.
- Breiman L. Random Forests. *Mach Learn*. 2001 Oct 1;45(1):5–32.
- Meier L, van de Geer S, Bühlmann P. The group lasso for logistic regression. *J R Stat Soc Ser B*. 2008;70(1):53–71..
- Rapaport F, Barillot E, Vert J-P. Classification of arrayCGH data using fused SVM. *Bioinformatics*. 2008 Jul 1;24(13):i375–82.
- Park MY, Hastie T, Tibshirani R. Averaged gene expressions for regression. *Biostatistics*. 2007 Apr 1;8(2):212–27.
- Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J, Ramakrishna M, Glodzik D, Zou X, et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*. 2016 02;534(7605):47–54.
- Stearns V, Yamauchi H, Hayes DF. Circulating tumor markers in breast cancer: accepted utilities and novel prospects. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;52(1–3):239–59.
- Juríková M, Danihel L, Polák Š, Varga I. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem*. 2016 Jun;118(5):544–52.
- Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Nov 16;103(22):1656–64.
- Shah MH, Telang SD, Shah PM, Patel PS. Tissue and serum alpha 2-3- and alpha 2-6-linkage specific sialylation changes in oral carcinogenesis. *Glycoconj J*. 2008 Apr;25(3):279–90.
- Oztürk LK, Emekli-Alturfan E, Kaşıkçı E, Demir G, Yarat A. Salivary total sialic acid levels increase in breast cancer patients: a preliminary study. *Med Chem Shariqah United Arab Emir*. 2011 Sep;7(5):443–7.
- Lee JA, Lee HY, Lee ES, Kim I, Bae JW. Prognostic Implications of MicroRNA-21 Overexpression in Invasive Ductal Carcinomas of the Breast. *J Breast Cancer*. 2011 Dec;14(4):269–75.
- Role of Increased Mir-29b-1 and Mir-29a in Endocrine-Resistant Breast Cancer : Metastasis and Tumor Progression, Neoplasia of Endocrine Tissue, Therapies for Cancer, and Tumorigenesis (post-ers). *ENDO Meet* [Internet]. [cited 2017 Nov 14]; Available from: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/endo-meetings.2016.TB.7.SUN-096>
- Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2017 Nov 14]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17948228>
- Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang C-Y. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol*. 2012 Mar;22(3):125–32.
- Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol*. 2010 Dec;28(6):655–61.
- Bertos NR, Park M. Breast cancer — one term, many entities? *J Clin Invest*. 2011 Oct 3;121(10):3789–96.
- Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin S-F, Dunning MJ, et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol*. 2007;8(10):R214.
- Bhattacharyya M, Nath J, Bandyopadhyay S. MicroRNA signatures highlight new breast cancer subtypes. *Gene*. 2015 Feb 10;556(2):192–8.
- Iorio MV, Ferracin M, Liu C-G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005 Aug 15;65(16):7065–70.

27. Li L, Xiao B, Tong H, Xie F, Zhang Z, Xiao GG. Regulation of breast cancer tumorigenesis and metastasis by miRNAs. *Expert Rev Proteomics*. 2012 Dec;9(6):615–25.
28. Asaga S, Kuo C, Nguyen T, Terpenning M, Giuliano AE, Hoon DSB. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer. *Clin Chem*. 2011 Jan;57(1):84–91.
29. Chen H, Liu H, Zou H, Chen R, Dou Y, Sheng S, et al. Evaluation of Plasma miR-21 and miR-152 as Diagnostic Biomarkers for Common Types of Human Cancers. *J Cancer*. 2016;7(5):490–9.
30. Gao J, Zhang Q, Xu J, Guo L, Li X. Clinical significance of serum miR-21 in breast cancer compared with CA153 and CEA. *Chin J Cancer Res*. 2013 Dec;25(6):743–8.
31. Matamala N, Vargas MT, González-Cámpora R, Miñambres R, Arias JI, Menéndez P, et al. Tumor microRNA expression profiling identifies circulating microRNAs for early breast cancer detection. *Clin Chem*. 2015 Aug;61(8):1098–106.
32. Ng EKO, Li R, Shin VY, Jin HC, Leung CPH, Ma ESK, et al. Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection. *PLoS One*. 2013;8(1):e53141.
33. Si H, Sun X, Chen Y, Cao Y, Chen S, Wang H, et al. Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Feb;139(2):223–9.
34. Wu Q, Lu Z, Li H, Lu J, Guo L, Ge Q. Next-generation sequencing of microRNAs for breast cancer detection. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:597145.
35. Mar-Aguilar F, Mendoza-Ramírez JA, Malagón-Santiago I, Espino-Silva PK, Santuario-Facio SK, Ruiz-Flores P, et al. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers. *Dis Markers*. 2013;34(3):163–9.
36. Shaker O, Maher M, Nassar Y, Morcos G, Gad Z. Role of microRNAs -29b-2, -155, -197 and -205 as diagnostic biomarkers in serum of breast cancer females. *Gene*. 2015 Apr 10;560(1):77–82.
37. Sochor M, Basova P, Pesta M, Dusilkova N, Bartos J, Burda P, et al. Oncogenic microRNAs: miR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum. *BMC Cancer*. 2014 Jun 18;14:448.
38. Sun Y, Wang M, Lin G, Sun S, Li X, Qi J, et al. Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer. *PLoS One*. 2012;7(10):e47003.
39. Györfy B, Hatzis C, Sanft T, Hofstatter E, Aktas B, Pusztai L. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Res BCR* [Internet]. 2015 [cited 2017 Nov 25];17(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4307898/>
40. Kittaneh M, Montero AJ, Glück S. Molecular Profiling for Breast Cancer: A Comprehensive Review. *Biomark Cancer*. 2013 Oct 29;5:61–70.
41. Wen HY, Krystel-Whittemore M, Patil S, Pareja F, Bowser ZL, Dickler MN, et al. Breast carcinoma with an Oncotype Dx recurrence score <18: Rate of distant metastases in a large series with clinical follow-up. *Cancer*. 2017 Jan 1;123(1):131–7.
42. Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 May 14;99(10):6567–72.
43. Furey TS, Cristianini N, Duffy N, Bednarski DW, Schummer M, Haussler D. Support vector machine classification and validation of cancer tissue samples using microarray expression data. *Bioinform Oxf Engl*. 2000 Oct;16(10):906–14.
44. UCI Machine Learning Repository: Breast Cancer Wisconsin (Diagnostic) Data Set [Internet]. [cited 2017 Nov 27]. Available from: [https://archive.ics.uci.edu/ml/datasets/Breast+Cancer+Wisconsin+\(Diagnostic\)](https://archive.ics.uci.edu/ml/datasets/Breast+Cancer+Wisconsin+(Diagnostic))
45. ArrayExpress < EMBL-EBI [Internet]. [cited 2017 Nov 27]. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>
46. Hamet P, Tremblay J. Artificial intelligence in medicine. *Metabolism*. 2017 Apr;69S:S36–40.
47. Samuel AL. Some studies in machine learning using the game of Checkers. *Ibm J Res Dev*. 1959;71–105.
48. Shivade C, Raghavan P, Foster-Lussier E, Embi PJ, Elhadad N, Johnson SB, et al. A review of approaches to identifying patient phenotype cohorts using electronic health records. *J Am Med Inform Assoc JAMIA*. 2014 Mar;21(2):221–30.
49. White RW, Tatonetti NP, Shah NH, Altman RB, Horvitz E. Web-scale pharmacovigilance: listening to signals from the crowd. *J Am Med Inform Assoc JAMIA*. 2013;20(3):404–8.
50. Kinsman L, Rotter T, James E, Snow P, Willis J. What is a clinical pathway? Development of a definition to inform the debate. *BMC Med*. 2010 May 27;8:31.
51. Mans RS, Aalst WMP van der, Vanwersch RJB. *Process Mining in Healthcare: Evaluating and Exploiting Operational Healthcare Processes* [Internet]. Springer International Publishing; 2015 [cited 2018 Feb 10]. (SpringerBriefs in Business Process Management). Available from: <http://www.springer.com/gb/book/9783319160702>
52. Mould DR. Models for disease progression: new approaches and uses. *Clin Pharmacol Ther*. 2012 Jul;92(1):125–31.
53. *Data Mining: Concepts and Techniques - 3rd Edition* [Internet]. [cited 2017 Nov 28]. Available from: <https://www.elsevier.com/books/data-mining-concepts-and-techniques/han/978-0-12-381479-1>
54. Han Z, Wei B, Zheng Y, Yin Y, Li K, Li S. Breast Cancer Multi-classification from Histopathological Images with Structured Deep Learning Model. *Sci Rep*. 2017 Jun 23;7(1):4172.
55. Houssami N, Lee CI, Buist DSM, Tao D. Artificial intelligence for breast cancer screening: Opportunity or hype? *Breast Edinb Scotl*. 2017 Dec;36:31–3.

**Received: 18 november 2017**

**Approved: 20 january 2018**

## NEWS AND VIEWS / NOTICIAS Y OPINIONES

### Four Ecuadorian students from Yachay Tech University invited to the Youth Winter Assembly 2018 Youth at the United Nations.

### Cuatro estudiantes ecuatorianos de la universidad Yachay Tech fueron invitados a la Youth Winter Assembly 2018 en las Naciones Unidas.

Victor Manuel Santiago Padilla

DOI. 10.21931/RB/2018.03.01.15

**ABSTRACT:** Twice a year The Youth Assembly of the United Nations takes place at the United Nations Headquarters with the objective to tackle our world's greatest challenges, gathering the brightest and most active young leaders from across the globe. This time during the winter ceremony four students from the Yachay Tech Ecuadorian University were invited so that they could learn about the organization and could meet people from all over the world who are also linked to the organization.

**Keywords:** Youth, Yachay Tech, Ecuador, United Nations.

**RESUMEN:** Dos veces al año The Youth Assembly of the United Nations se lleva a cabo en la Sede de las Naciones Unidas con el objetivo de abordar los mayores desafíos de nuestro mundo, reuniendo a los jóvenes líderes más brillantes y activos de todo el planeta. Esta vez durante la ceremonia de invierno fueron invitados cuatro estudiantes de la universidad ecuatoriana Yachay Tech para que pudieran aprender sobre la organización y tener la posibilidad de conocer personas de todo el mundo también vinculados a esta.

**Palabras claves:** Jóvenes, Yachay Tech, Ecuador, Naciones Unidas.

**H**undreds of youth, including several Ecuadorians, convened in New York February 14-16 for the 2018 Youth Assembly. The Winter gathering takes place at the United Nations headquarters.

On 2015, the United Nations announced the 17 Sustainable Development Goals to be achieved before 2030 (figure 1) and encourage public sector, private sector, society and academia to join to accomplish the goals. This year's edition placed a special emphasis on goals 6 (Clean Water and Sanitation), 7 (Renewable Energy), 11 (Sustainable Cities and Communities), 12 (Responsible Consumption) and 15 (Life on Land).

The winter session of the symposium also underscored the importance of involving young people in the global movement for inclusive and sustainable development.

The annual assembly provides youth delegates with the opportunity to attend several panel discussions, seminars, workshops, and training sessions. The goal of these activities is to enrich young people's knowledge to become active leaders and committed citizens in their communities.

From Ecuador, students from the Yachay Tech Emblematic University (figure 2) participated as delegates, they were Nicolas Serrano Palacio the actual Youth network coordinator from Sustainable Development Solutions Network (SDSN) in Andean region, Emilia Calle Luzuriaga is the Youth Campus coordinator in SDSN, Leandro Santiago Padilla, and Maria José De la Torre as Secretariat supporters. It is the first time that students from Yachay Tech university participate in this event".

"We will be the generation that resolves humanities past mistakes regarding our environment. Is on scenarios like this, where we, as youth leaders, can make our voices heard, where we can network and start working for a common goal. For me, it was a great learning experience, since we got to see all the current global issues, from the perspective of hundreds of people from around the globe, allowing me to interpret things with a different manner. Now, with the knowledge acquired, is our time to give our

part back to the Andean Region and start working on promoting the SDGs and more sustainable mindset on the population." Said Leandro Santiago (figure 3), current Biology Yachay Tech student and SDSN youth Andes volunteer.

"I believe in youth's passion and creativity to help reach the global goals. This kind of events help us connect with other youth leaders around the globe and learn about their initiatives. It also gives us the opportunity to be part of talks and workshops to learn more about this worldwide challenge. The best thing we could do after this event, is to apply your knowledge in our local communities and help achieve the Sustainable Development Goals." said Nicolas Serrano (figure 4).

Emilia Calle Luzuriaga, who took part in the 2018 Youth Assembly, is a Chemistry undergraduate student. She said that the assembly was a wonderful experience that promotes social actions as well as active citizenship and join global change makers committed with sustainable development.

"The Agenda 2030 not only needs great solution projects, but also empowered people leading them. To attend the conference was perfect to share experience and disruptive ideas and make friends with more eager minds. I realized social engagement with sustainable development is a truly complex challenge. We, the youth, must be committed to spread out our voices to influence in the decisions of our governors." Said Maria Jose De la Torre, Nanotechnology student and SDSN Youth Andes volunteer.

With a global population of over 1.8 billion people, youth are the world's greatest untapped resource, possessing the talents and ambition to overcome society's biggest challenges.

To achieve the 2030 Agenda, it is imperative to engage youth as beneficiaries, stakeholders, and leaders in the global movement for inclusive and sustainable development. The 2018 Winter Youth Assembly was a platform to elevate the voices of young people in international dialogues, empower youth to advocate for future generations, and mobilize youth as agents of impactful change.

<sup>1</sup> Estudiante de comunicación social en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra



# SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOALS



562

**Figura 1.** Revista Bionatura supports the sustainable Development Goals. On September 25th, 2015, countries adopted a set of goals to end poverty, protect the planet and ensure prosperity for all as part of a new sustainable development agenda. Each goal has specific targets to be achieved over the next 15 years. For the goals to be reached, everyone needs to do their part: governments, the private sector, civil society and people like you.



**Figura 2.** Yachay Tech students at the United Nations Headquarters from left to right Maria José De la Torre, Nicolas Serrano Palacio, Emilia Calle Luzuriaga and Leandro Santiago Padilla.



**Figura 3.** Leandro Santiago, Biology Yachay Tech student and SDSN youth Andes volunteer.



**Figura 4.** Nicolas Serrano actual Youth network coordinator from Sustainable Development Solutions Network (SDSN) in Andean region.



**Figura 5.** Emilia Calle Luzuriaga chemistry student at Yachay Tech and Youth Campus coordinator in SDSN



**Figura 6.** Yachay Tech students outside the United Nations Headquarters from left to right Maria José De la Torre, Nicolas Serrano Palacio, Leandro Santiago Padilla and Emilia Calle Luzuriaga.



