

Bionatura

Chemicals: how good or bad are they?

Pharmacogenomic assessment of an acute colitis model

Cáncer de pulmón

Enterocolitis necrotizante

Condiloma acuminado

Cellular reprogramming

Schizophrenia related genes

Biodiesel

Suelos contaminados por metales pesados

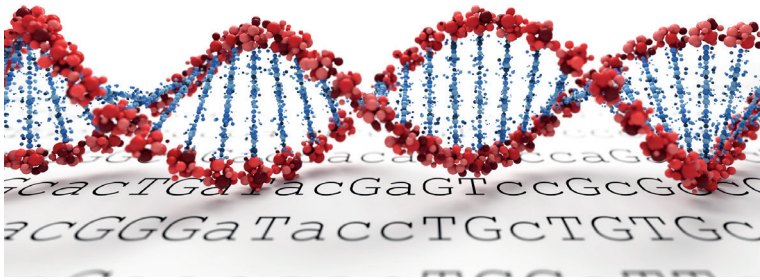


Universidad Católica de Oriente

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

ISSN: 1390-9347 (Versión impresa)

Formato: 21 x 29,7 cm

ISSN: 1390-9355 (Versión electrónica)

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

Publicación periódica trimestral

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

Instrucciones a los autores en:

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

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

EDITORIAL

- Chemicals: how good or bad are they? 571
Productos químicos: ¿qué tan buenos o malos son?
Hortensia Maria Rodriguez Cabrera

LETTER TO EDITOR / CARTA AL EDITOR

- Enfermedad de Chagas en Ecuador: reflexiones al informe de la OPS 2018 574
Chagas disease in Ecuador: reflections on the PAHO 2018 report
Diego Valarezo-Sevilla and Vanessa Sarzosa-Terán

RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

- Pharmacogenomic assessment of an acute colitis model 577
Evaluación farmacogenómica de un modelo de colitis aguda
Roca J, Camacho H, Guillen IA, Aguilera A, Palenzuela DO, Silva JA, Estrada R, Gell O, Berlanga J and Novoa LI
- Ventajas del uso del biodiesel B10 (*Ricinus communis*) sobre el Diésel fósil en la protección del medio ambiente 582
Advantages of the use of biodiesel B10 (Ricinus communis) on Diesel fossil in the protection of the environment
Carlos Nolasco Mafla Yépez, Juan Carlos García Montoya, Marco David Revelo Aldas, Erik Paúl Hernández Rueda, Ignacio Bayardo Benavides Cevallos
- Comparación de los Niveles de Concentración de Ozono Troposférico y Dióxido de Nitrógeno en Ecuador y Otras Latitudes 586
Comparison of tropospheric ozone and nitrogen dioxide concentration levels in Ecuador and other latitudes
Manuel A. Andino-Enríquez, Sandra P. Hidalgo-Bonilla, Luis A. Ladino
- Análisis de comunidades bacterianas asociadas a la rizósfera de especies vegetales *Miconia zamorensis* y *Erato polymnoides* en suelos contaminados por metales pesados. 596
Bacterial community analysis associated to rhizosphere plant species of Miconia zamorensis and Erato polymnoides in heavy metals polluted soils.
Manuel Alexander Rojas . Oscar Amable Vivanco Galván

Aplicación de la electroterapia para la eliminación del virus del mosaico del pepino (CMV) en plantas micropropagadas de banano (<i>Musa</i> spp.) <i>Application of electrotherapy for the elimination of cucumber mosaic virus (CMV) in micropropagated banana plants (Musa spp.)</i>	602
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

José García Onofre, Alberto Montes Carballal, Efrén Santos Ordoñez, José Flores Cedeño

Cepas autóctonas de <i>Bacillus subtilis</i> como agente de biocontrol in vitro de <i>Alternaria</i> spp. en <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> <i>Native strains of Bacillus subtilis as a biocontrol agent in vitro Alternaria spp. In Brassica oleracea var. italica</i>	607
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Acurio, R., Ñacato, C.

Prueba de Semmes Weinstein en radiculopatía <i>Semmes Weinstein test in radiculopathy</i>	612
----------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Daniilo Ruiz Reyes, María Elena Romo, Hugo Pereira Olmos

CASE REPORTS / REPORTE DE CASO

Enterocolitis necrotizante. presentación de dos casos clínicos <i>Necrotizing enterocolitis. presentation of two clinical cases</i>	615
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Nathaly Lapo, Fausto Vásquez, Pablo Olmedo

REVIEW / ARTÍCULO DE REVISIÓN

Condiloma acuminado. Situación actual <i>Condyloma acuminata. Current situation</i>	619
----------------------------------------------------------------------------------------	-----

Adrian Isacc Nieto Jiménez

NEWS AND VIEWS / NOTICIAS Y OPINIONES

A review of cellular reprogramming: limitations and recent advances <i>Revisión sobre la reprogramación celular: límites y avances recientes</i>	626
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Doménica Encalada Barahona, Mateo Flores Naranjo, Camila Viera Herrera

Schizophrenia related genes and its molecular treatments: systematic review and analysis	630
------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Los genes relacionados con la esquizofrenia y sus tratamientos moleculares: revisión sistemática y análisis

Isaac Bravo, Freddy Figueroa, Cristhian Preciado

EDITORIAL

Chemicals: how good or bad are they?

Productos químicos: ¿qué tan buenos o malos son?

Hortensia Maria Rodriguez Cabrera.

DOI. 10.21931/RB/2018.03.02.1

The simplest definition of chemicals establishes that there are elements, or a combination of elements, with a specific composition and structure. This means that all matter is made of chemicals! However, in today's world, this term is often misunderstood and misrepresented. Chemicals are considered offensive, feared, are also treated as the source of cancer and many other illnesses according to some anti-science movements. Because of this, they are given a bad reputation. I think everyone, even those of us who are irked by this popular misuse of the term "chemical", must be reminded that absolutely everything is a chemical: we are chemicals, the air we breathe are chemicals, the food we consume are chemicals, which are digested by chemicals, and that turn them into more chemicals.

Chemistry is everywhere, so why does it scare us so much then? Chemophobia is an irrational fear of chemicals. It includes the fear of sugar or additive in food, formaldehyde in shampoo or aluminium in vaccines. Fitness bloggers, quack doctors and even small cosmetic companies take advantage of these quirks to sell fake-natural products at elevated prices. Almost always, the same people who spread a fear of chemicals also have "chemical-free" products for sale. The simple word "chemical" is often synonymous of toxins or poison. People use phrases like "it's full of chemicals" to say that something is artificial and, therefore, bad. Besides, meaningless labels, such as "without chemicals," are seen in products sold in "health" food stores, referring to the fact that the mentioned foods are "free of synthetic chemicals". Perpetrators of chemo phobia create unnecessary guilt, stress and anxiety as consumers worry about making the right choices for their family. Consumers are the victims in this battle as pro-natural and anti-natural businesses spread fear about each other's products. In my view as chemist, I do not understand the distinction. Why are synthetic chemicals worse than natural ones? Why is the synthetic E300 additive considered bad while the vitamin C found in orange juice is good? (Even though they are the same thing).

Nowadays, society seems to demonize any type of chemical substance, especially as a consequence of the advertising and promotion strategies of the industry related to these chemical-free products. What is really "natural"? What do we mean by "artificial"? For example, food additives are substances that are intentionally added to food products to carry out certain functions, the most common being to provide color, contribute to the flavor or help in its conservation. There seems to be a generalized idea that additives are only used by manufacturers to make the product more attractive or cheaper, but in reality its use goes further. They are elements with a technological function, which is fundamental in the food production chain, since they help to stabilize it during its preparation, packaging and storage, thus ensuring the best conditions for the health of the consumer. One of the problems that derive from the regulations is the way in which they are labeled. To achieve uniformity in all countries, additives are collected under specific names that can sometimes confuse the consu-

mer. The problem is that these denominations are presented to the consumer in a too "scientific" and cold way, giving the impression that an ingredient that is recognized by a series of numbers is "artificial"¹. However, if we were to find out which additive each E number refers to, we could take more than one surprise. For example, E-330 corresponds to citric acid, naturally present in fruit, and so it is with many other elements.

Another illustrative example relating to chemophobia, the misinformation and general ignorance of people are the campaigns appeared in newspapers and social networks some time ago, showing how dangerous could be the dihydrogen monoxide (DHMO). Authors describe the DHMO as a colorless substance, with hardly any odor and difficult to detect because of its mild flavor, but also as responsible for the death of thousands of people every year. Most of these deaths are attributed to this chemical by accidental inhalation, but the describe danger of this substance does not end here for these false scientists. They also state that prolonged exposure to the solid form of this substance can cause serious damage to human tissues and that the symptoms of ingestion of DHMO include excessive sweating and a large amount of urine and occasionally nausea, vomiting and electrolyte imbalances. For those patients who stop taking it, it means without exception, death². All these affirmations are mainly true, but of course it's about water, dihydrogen monoxide, or more briefly: H₂O³.

A few years ago the Royal Society of Chemistry promised to give a million pounds to anyone who found a substance that was 100% free of chemicals. It was a satirical way of showing to the population that "chemistry" does not have to mean "poison", as it seems they want us to believe from the food industry and its advertising. The truth is that everything that surrounds us is made up of chemical substances (Royal Society of Chemistry, 2010-2012)⁴.

Concluding, due to research and scientific advances we now have access to a wider range of foods, cosmetics, drugs, among others useful things, which are also safer for consumption. By having to pass many controls and have certain additives, we are guaranteed much more security. Advertising makes us believe that everything related to chemicals is bad, and what is supposed to be natural is good, which is not true. Always remember that chemistry is fascinating precisely because it can be used to synthesize new things. It's like a molecular Lego. The fact that everything is made of just over 100 basic components is extraordinary. Only by putting chemicals in a pot in the correct way can the world around us be built. Let's not be gullible and get closer to science.

Bibliographic references

1. CATHY STEPHENSON. The good and bad of food additives | Stuff.co.nz. Stuff.co.nz. 2012.<http://www.stuff.co.nz/life-style/well-good/7787458/The-good-and-bad-of-food-additives> (accessed 6 Jun2018).

2. James K. Glassman. DIHYDROGEN MONOXIDE: UNRECOGNIZED KILLER - The Washington Post. Washington Post. 1997.https://www.washingtonpost.com/archive/opinions/1997/10/21/dihydrogen-monoxide-unrecognized-killer/ee85631a-c426-42c4-bda7-ed63db993106/?utm_term=.e7ffc5db290 (accessed 6 Jun2018).
3. Mikkelson D. FACT CHECK: Is Dihydrogen Monoxide Dangerous? Snopes. 2018.<https://www.snopes.com/fact-check/dangers-dihydrogen-monoxide/> (accessed 6 Jun2018).
4. £1million bounty offered for UK's first chemical-free product. R. Soc. Chem. 2010.<http://www.rsc.org/AboutUs/News/PressReleases/2010/CTPA100ChemicalFree.asp> (accessed 6 Jun2018).



LETTER TO EDITOR / CARTA AL EDITOR

Enfermedad de Chagas en Ecuador: reflexiones al informe de la OPS 2018. Chagas disease in Ecuador: reflections on the PAHO 2018 report.

Diego Valarezo-Sevilla¹ and Vanessa Sarzosa-Terán²

DOI. 10.21931/RB/2018.03.02.2

574

En mayo del 2018, se llevó a cabo en Washington DC una reunión de expertos organizada por la OPS para tratar temas relacionados con la actualidad, salud pública y visión a futuro de la enfermedad de Chagas en las Américas. El documento, tras una bien lograda introducción, recoge los objetivos específicos, las conclusiones y recomendaciones¹ subdividido en seis segmentos: Transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas, Transmisión transfusional de la enfermedad de Chagas, Atención en la enfermedad de Chagas, Transmisión congénita de la enfermedad de Chagas, El complejo desafío de la enfermedad de Chagas: pacientes, comunidad, organización con base civil y cooperantes internacionales, Vigilancia y acceso a información sobre la enfermedad de Chagas.

Tras analizar los objetivos específicos, conclusiones y recomendaciones para cada situación en particular, nos asaltan varios interrogantes y situaciones a considerar:

Dentro de los participantes en dicha reunión no se menciona a ningún representante del Ecuador, ¿Cuáles fueron los motivos? pueden ser varios, no invitaron a asistir a ningún representante(s) ecuatoriano(s), lo invitaron, pero no acudieron, alguien fue, pero no consta en el documento, no lo sabremos, solo podemos especular. Se menciona en el primer segmento (Transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas) que el control vectorial ha sido eficaz para la eliminación de especies domiciliarias alóctonas en 6 países, así como su control en la superficie total o parcial de otros 11 países, lo que conlleva a la interrupción de la transmisión vectorial de *Trypanosoma cruzi* en 17 países de la región. ¿Porque no se mencionan específicamente cuales son estos países? Un documento tan importante no debería omitir información como esta, las experiencias de aquellos países en los que se realizó este logro podrían emularse en los otros que aún no han podido conseguirlo. Si nos trasladamos por un momento al sitio web oficial² del Ministerio de Salud Pública del Ecuador, no se puede obtener ningún tipo de información al respecto; cabe anotar sin embargo que recientemente se ha publicado información por parte de otros investigadores donde se menciona que en nuestro país la enfermedad no se ha controlado³.

En el tercer segmento se recomienda que los medicamentos de tratamiento etiológico para enfermedad de Chagas estén disponibles con acceso universal y gratuito, en todas sus presentaciones (para adultos y pediátricas). En el Cuadro Nacional de Medicamentos Básicos de nuestro país, vigente a la presente fecha (novena revisión)⁴, no consta el nifurtimox; el medicamento registrado es el benznidazol de 50 y 100mg como sólido oral y se encuentra autorizado uso para cualquier de los tres niveles de atención de los servicios de salud, sujeto a la definición de protocolos, sin embargo el acceso real al medicamento es complicado por la falta de oferentes o distribuidores, por lo tanto que proponen los estados de los diferentes países o la OPS/OMS para fortalecer el acceso al tratamiento?

Se menciona también en el tercer segmento, que para el personal de salud (médicos, enfermeras, técnicos, asistentes, etc.), el conocimiento sobre la enfermedad de Chagas debe ser objeto de un proceso de capacitación y actualización permanente. ¿Con respecto a esta recomendación, cuando fue la

última vez que el Ministerio de Salud Pública realizó una capacitación (por el método que fuere, presencial o virtual) sobre Chagas?

En el cuarto segmento (Transmisión congénita de la enfermedad de Chagas), que habla sobre el "Marco para la Eliminación de la Transmisión Materno Infantil del VIH, sífilis, la hepatitis B, y la enfermedad de Chagas (ETMI-Plus)", se recomienda realizar en los controles prenatales, el tamizaje universal serológico de toda embarazada, para establecer procedimientos diagnósticos, y de tratamiento en caso de infección comprobada del recién nacido. En la actualidad en nuestro país y por diversas situaciones (acceso a los servicios de salud, disponibilidad de recursos técnicos, etc.) lamentablemente no se cumple.

Para finalizar, en el sexto segmento, se habla de establecer una metodología que permita medir la carga de la enfermedad, teniendo en cuenta la asimetría de las capacidades de los sistemas de vigilancia en los países. Existen varios estudios publicados de sero-prevalencia / sero-epidemiología para *Trypanosoma cruzi* en personas de diferentes regiones del Ecuador⁵⁻¹², sin embargo aún no contamos con una caracterización clínica de las personas que padecen la enfermedad y de sus complicaciones, por lo tanto desconocemos el patrón evolutivo de nuestros pacientes ecuatorianos con Chagas, siendo el último reporte de hace casi 20 años¹³.

Esperamos fielmente que los avances y los esfuerzos que realizan las diferentes entidades estatales y no estatales de nuestro país y del extranjero, que trabajan conjuntamente para la lucha contra el Chagas y las otras enfermedades tropicales desatendidas, siga adelante y se fortalezca cada vez más por el bien de toda nuestra comunidad.

Bibliographic references

1. OPS/OMS. Enfermedad de Chagas en las Américas: una revisión de la situación actual de salud pública y su visión para el futuro. Informe: conclusiones y recomendaciones. Washington D.C., mayo 3 y 4 de 2018 [citado 25 mayo 2018]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=45142&Itemid=270&lang=en
2. Gobierno de la República del Ecuador. [Internet]. Quito: Ministerio de Salud Pública; 2018 [citado 26 abril 2018]. Disponible en: <https://www.salud.gob.ec/?s=CHAGAS>
3. Dumonteil E, Herrera C, Martini L, Grijalva MJ, Guevara AG, Costales JA, et al. Chagas disease has not been controlled in Ecuador. PLoS ONE. 2016 [citado 24 abril 2018]; 11(6): e0158145 [Aprox 3 p.]. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0158145>
4. Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Cuadro nacional de medicamentos básicos. Registro Terapéutico Nacional 9na. Revisión. 2014 [citado 26 abril 2018]; [Aprox 896 p.]. Disponible en: http://www.conasa.gob.ec/phocadownload/cnmb9na/Cuadro_Nacional_de_Medicamentos_Basicos_9na_Revisioin
5. Quito S, Herrera J, Puertas S, Guerrero D, Medina B. Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en Aguarico, provincia de Orellana. Selva amazónica ecuatoriana 2008-2015. Revista científica digital INSPILIP. 2017 [citado 26 abril 2018]; [Aprox

- 20 p.]. Disponible en: <http://www.inspilib.gob.ec/wp-content/uploads/2018/03/17-revisi%C3%B3n-de-art%C3%ADculo-de-Chagas-Abril-20177.pdf>
6. Carrera-Vargas C, Narváez AO, Muzzio-Aroca J, Shiguango G, Martini-Robles L, Herrera C, et al. Seroprevalence of Trypanosoma cruzi infection in schoolchildren and in pregnant women from an amazonian region in Orellana province, Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2015 [citado 26 abril 2018]; 93(4): 774-8. Disponible en: <http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/93/4/774.pdf?expires=1532717215&id=id&accname=guest&checksum=F54B0CB7376DC92A100B7133EC3DB8B4>
 7. Costales JA, Sánchez-Gómez A, Silva-Aycaguer LC, Cevallos W, Tamayo S, Yumiseva C, et al. A national survey to determine prevalence of Trypanosoma cruzi infection among pregnant women in Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2015 [citado 26 abril 2018]; 92(4): 807-10. Disponible en: <http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/92/4/807.pdf?expires=1532715866&id=id&accname=guest&checksum=B0D77939849792D-1B2147AA5B596F171>
 8. Guevara A, Moreira J, Criollo H, Vivero S, Racines M, Cevallos V, et al. First description of Trypanosoma cruzi human infection in Esmeraldas province, Ecuador. *Parasites & Vectors.* 2014 [citado 26 abril 2018]; 7:358 [Aprox 3 p.]. Disponible en: <https://parasite-sandvectors.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1756-3305-7-358>
 9. Guevara A, Atherton R, Wauters M, Vicuña Y, Nelson M, Prado J, et al. Seroepidemiological Study of Chagas Disease in the Southern Amazon Region of Ecuador. *Tropical Medicine and Health.* 2013 [citado 26 abril 2018] 41(1): 21-5. Disponible en: https://www.jstage.jst.go.jp/article/tmh/41/1/41_2012-31/_pdf/-char/en
 10. Amunárriz M, Quito S, Tandazo V, López M. Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en el cantón Aguarico, Amazonía ecuatoriana. *Rev Panam Salud Publica.* 2010 [citado 26 abril 2018]; 28(1): 25-9. Disponible en: <https://www.scielosp.org/pdf/rpsp/2010.v28n1/25-29/es>
 11. Black CL, Ocaña-Mayorga S, Riner D, Costales JA, Lascano MS, Arcos-Terán L, et al. Seroprevalence of Trypanosoma cruzi in rural Ecuador and clustering of seropositivity within households. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009 [citado 26 abril 2018]; 81(6): 1035-40. Disponible: <http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/81/6/1035.pdf?expires=1532718848&id=id&accname=guest&checksum=53046914D6235840BDC-52880CD93F272>
 12. Grijalva MJ, Escalante L, Paredes RA, Costales JA, Padilla A, Rowland EC, et al. Seroprevalence and risk factors for Trypanosoma cruzi infection in the amazon region of Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003 [citado 26 abril 2018]; 69(4): 380-5. Disponible en: <http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/69/4/0690380.pdf?expires=1532720101&id=id&accname=guest&checksum=14EEE13D0F479F9043C72DCE-C926FA08>
 13. Aguilar HM, Abad-Franch F, Racines J, Paucar A. Epidemiology of Chagas disease in Ecuador. A brief review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999 [citado 26 abril 2018]; 94, Suppl. I: 387-93. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v94s1/6400.pdf>



RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

Pharmacogenomic assessment of an acute colitis model. Evaluación farmacogenómica de un modelo de colitis aguda.

Roca J¹, Camacho H^{1*}, Guillen IA^{1*}, Aguilera A², Palenzuela DO¹, Silva JA¹, Estrada R¹, Gell O¹, Bertanga J¹ and Novoa LI¹.

DOI. 10.21931/RB/2018.03.02.3

Abstract: Among the different models developed to understand the biology of inflammation in ulcerative colitis (UC), the model of colitis induced by Dextran sulfate Sodium (DSS) is the most used because of its simplicity, its cost effectiveness and similarity with ulcerative colitis in humans. It's known that DSS can change the expression of some genes. The aim of this work is to know the changes in the expression profile of Ulcerative Colitis Disease (UCD) related genes in the colon of rats treated for 5 days with 8% DSS, in order to better characterize this model. The workflow consisted in the biopsy collection from distal colon, followed by total RNA extraction and analysis of gene expression by quantitative RT-PCR (qPCR) of 55 genes related to inflammation, epithelial integrity, oxidative stress, as well as proliferation and differentiation cellular. Sixty percent of the analyzed genes change their expression with statistical significance, 5 genes were upregulated and 28 genes were downregulated. The upregulated genes are related with inflammation and oxidative stress. The downregulated genes are related with the integrity of the epithelial barrier and also with cellular proliferation and differentiation, both processes involved in the intestinal epithelial renovation. These results support the use of this animal model in the development of new drugs against ulcerative colitis.

Key words: dextran sodium sulfate, ulcerative colitis disease, animal model, qPCR analysis.

Introduction

Ulcerative Colitis (UC) is a multifactorial disease of complex etiology that is not yet fully deciphered.

It is widely accepted that UC is an immune condition as a consequence of a deregulated contact between the microbiota and the colon, associated with chronic inflammation and oxidative stress (OS)^{1,2}.

The intestinal epithelium and mucopolysaccharides overlying form a physical barrier which limits access of intestinal microbiota to the submucosa. At the same time, the mucus layer also contains antimicrobial proteins such as IgA that form a biological barrier, which contributes to maintaining immune homeostasis^{3,4,5}.

The intestinal epithelium is in constant renewal, from the intestinal stem cells (ISC), residents in the crypts of the intestinal epithelium⁶.

The Wnt / β -catenin pathway is one of the fundamental pathways in the differentiation of intestinal cells. β -catenin ac-

Resumen: Entre los diferentes modelos desarrollados para comprender la biología de la inflamación en la colitis ulcerosa (CU), el modelo de colitis inducido con dextran sulfato sódico (DSS) es el más utilizado por su simplicidad, su costo y similitud con la colitis ulcerosa en humanos. Se sabe que DSS puede cambiar la expresión de algunos genes. El objetivo de este trabajo es conocer los cambios en el perfil de expresión de los genes relacionados con la enfermedad de colitis ulcerosa en el colon de ratas tratadas durante 5 días con de DSS al 8%, con el fin de caracterizar mejor este modelo. El flujo de trabajo consistió en la recolección de biopsias del colon distal, seguida de extracción de ARN total y el análisis de expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa (qPCR) de 55 genes relacionados con inflamación, integridad epitelial, estrés oxidativo, así como proliferación y diferenciación celular. Sesenta por ciento de los genes analizados cambian su expresión con significación estadística, 5 genes aumentaron su expresión y 28 genes estaban disminuyeron en su expresión. Los genes con elevada expresión están relacionados con la inflamación y el estrés oxidativo. Los genes con expresión disminuida se relacionan con la integridad de la barrera epitelial y también con la proliferación y diferenciación celular, ambos procesos implicados en la renovación del epitelio intestinal. Estos resultados apoyan que este modelo animal pueda ser usado en el desarrollo de nuevos fármacos contra la colitis ulcerosa.

Palabras clave: dextran sulfato sódico, enfermedad de colitis ulcerativa, modelos animales, análisis por RCP cuantitativo.

tivates specific transcriptional factors that control differentiation in different types of intestinal epithelial cells⁷.

β -catenin is positively regulated by the PI3k/AKT pathway and by the enzyme Casein kinase (CSNK)^{7,8,9}.

In the process of differentiation, ISCs generate Transit amplifying Cells (TAC), which continue to differentiate into adult intestinal epithelial cells. The TAC compartment also maintains an active proliferation process, which is stimulated through EGF¹⁰.

The model of colitis based on the use of Dextran Sulphate Sodium (DSS) is the most commonly used to study several aspects of this disease such as therapy and pathogenesis (especially the role of the permeability and destruction of epithelium), it's a simple and inexpensive model. In general, acute colitis is induced using high concentrations of DSS for short periods of time (4-14 days)¹¹.

Although DSS-induced colitis is thought to be caused by direct cytotoxicity, it is reported that colitis by DSS can change the expression profile of certain genes^{12,13}.

In order to have a molecular evidence for the effectiveness of DSS in generating an experimental model of UC in rats, we explored by qPCR the gene expression profile of 61 IBD related genes in biopsies taken from distal colon of rats treated with DSS.

¹ Biomedical Research Division. Center for Genetic Engineering and Biotechnology. La Habana. Cuba

² Development Division. Center for Genetic Engineering and Biotechnology. La Habana. Cuba

* These authors equally contributed to these results

Materials and methods

Experimental Design

Ten male Wistar Rats weighing 300-400 grams were divided randomly into two equal groups (n=5). The animals were housed in specific pathogen-free conditions according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals¹⁴. Colitis was induced by adding 8% DSS 40KDa (Applichen, Germany) to drinking water, ad lib., during five days. (Fig 1).

Rats from day 0 and 6 were sacrificed and tissues from distal colon were collected. The tissue was longitudinally cut and preserved in RNeasy[®] Solution (Ambion, AB apply Biosystem, USA) for RNA isolation.

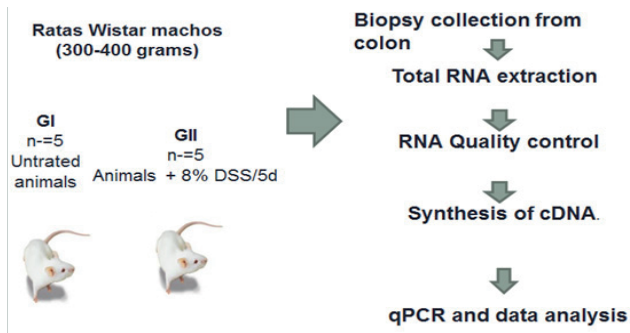


Figure 1. Workflow: from treatment of rats with DSS until qPCR analysis.

Isolation of RNA

Samples were processed on a Tissue Lyser unit (Qiagen, Hilden, Germany), extracting total RNA with RNeasy[®] Plus (QIAGEN GmbH, Germany) using the Quiacube platform. RNA purity and yield were determined using a NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA), and RNA integrity number (RIN) was determined using a Bioanalyzer (Agilent, 2100, USA).

cDNA synthesis

First-strand complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1µg total RNA using Superscript III First-Strand Synthesis Supermix for RT-PCR (Invitrogen Technologies, Carlsbad, California, USA) and oligo-dT primers following fabricant's instructions.

qPCR and Bioinformatics Tools

The primer3 web application was used to design 26 qPCR primers with a length of 22 bases and an average GC content of 50% (table 1)¹⁵. Genes as: GAPDH, MAP2K5, MAPK6, RPL13A and YWHAZ were selected and tested as reference, due to the stability of their transcription levels across the entire sample set. We employed real-time PCR to analyze gene expression levels in colon samples of animals treated with 8% DSS (GII) vs. untreated (GI). A total of five biological replicates from each group were included, using also three technical replicates per gene.

The reactions were performed in a volume of 20 µl, including 10 µl of PCR TM Absolute QPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific), 6 µl of primers (70 nM) and 4 µl of cDNA diluted by a factor of 25. The reactions were incubated in an optical detection rotor for 36 tubes at 95°C for 15 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s. qPCR data analysis was performed with CapitalBio RT-Cycler series analysis software, Version 2.001 (CapitalBio Co., Ltd., Beijing,

China). Relative quantification of gene expression was performed using the software REST 2009 v2.0.13 (Qiagen GmbH, Germany). The LingReg software (version 11.3, 2009, Amsterdam, Netherlands) was used to estimate the efficiency of PCR and, the geNorm software was used for the selection of more stable reference genes in a given cDNA sample panel¹⁶.

Evaluation of gene expression of the EGF / PDGF pathways

The qPCR was performed in Light Cycler 480 (Roche, Germany), following the protocol: Real time PCR for RT2 profiler PCR array format C, in 96 well plates of EGF / Pdgf signaling pathway (cat: PARN040Z, Quiagen, Germany). The standardization experiments of the qPCR, the evaluation of reference genes as well as the differential expression of the interest genes was performed simultaneously using bioinformatic package RT2 profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 (Qiagen GmbH, Germany).

In all cases, Changes in expression were considered statistically significant when the P value is less than 0.05.

Results

Eight of the ten genes related to inflammation and oxidative stress increased their expression, five of them did so with statistical significance (IL-6, TIMP1, NFKB, INOs and NOX01) (figure 2A.). The five genes involved with the integrity of the epithelial barrier decreased their expression, two of them significantly (TFF3 and PIGR) (figure 2B).

With respect to the genes related to the cell differentiation process, a significant decrease in the ELF3 and KLF4 transcription factors of the Wnt / catenin pathway was observed (figure 2C). In relation to the genes that regulate the activation of catenin, a statistically significant decrease was observed in five genes of the PI3K-AKT pathway and the CNS-K2B gene of casein kinase (figure 2D).

On the other hand, there was a general decrease in the expression of the genes of the growth factor pathway, being statistically significant in eleven of them (EGF, Pdgfa, Pdgfb, Gab1, Bcar, Nck2, RAP1A, RAFa1, MAPK1, MAPK3 and MAPK9) (figure 2E).

Discussion

The increased expression of genes related to inflammation and oxidative stress, suggest the existence of these processes in the colon of the animal model (figure 2A).

The intestinal epithelium constitutes a physical barrier that protects the submucosa from the intestinal microbiota. Mucin2 and trefoil factor form a layer that covers and protects the intestinal epithelium. In addition, the trefoil factor, through its anti-apoptosis function, enables the intestinal cells to migrate and cover the ulcer areas, allowing the restoration of the epithelium^{3,4}.

IgA antibodies in mucosal secretion contribute to immune homeostasis by limiting the access of environmental antigens and microbiota to the submucosa. The PIGR gene codes for the Fc receptor that facilitates the secretion of IgA. It is reported that the decrease in the expression of the PIGR gene in the colonic mucosa is correlated with the severity of the inflammatory bowel disease¹⁷.

Therefore, decreased expression of the TFF3 and PIGR genes (figure 2B) could compromise the integrity of the epithelial barrier, a key factor in the development of ulcerative colitis.

Table 1. Primer sequences used for q PCR analysis, of genes related with inflammation, oxidative stress, Epithelial Integrity, transcription factors involved in differentiation of intestinal epithelial cells (IEC) and reference genes.

Gene Name	Accession No.	Sense Primer 5'-3'	Antisense Primer 5'-3'	Biological function
IL6	NM_000600.4	GATACCACCCACA ACAGACCAG	CAGTGCATCATCGCTG TTCATA	Inflammation
TIMP1	NM_003254.2	CTCAGCAAAAGGC CTTCGTA	AGCCCATGAGGATCTG ATCTGT	Inflammation
NFKB1	NM_001165412.1	GATGGGACGACAC CTCTACACA	CCAAGAGTCGTCCAGG TCATAG	Inflammation
MMP2	NM_001127891.2	AGCGAGCAGAGAC TCAAGGTTT	GTTGATGCGGATACAG CGATAG	Inflammation
PTGS2	NM_000963.3	ACAGATTGCTGGCC GGGTTGCT	TGGAGGCCTTTGCCAC TGCTTGT	Inflammation
INOS	NM_000625.4	GGAAGAAATGCAG GAGATGGTC	TTTCTGCAGGATGTCT TGAACG	Oxidative stress
NOXO1	NM_001267721.1	GCAGTCGCCCTGAT GAGCTA	TGTCTGGCCATTATAC CTGCAC	Oxidative stress
GPX2	NM_002083.3	GGAACAACACTACC GGGACTACA	GGCTGTTCAGGATCTC CTCAT	Oxidative stress
SOD2	NM_000636.3	GGAGCAAGGTCGC TTACAGATT	ATAGTAAGCGTGCTCC CACACA	Oxidative stress
CAT	NM_001752.3	AAGCGCTCAACA GTGCTAATG	AGCTGAGCATCTTCA GGTGGT	Oxidative stress
MUC2	NM_002457.3	CAATCAAGCTGCCA TGACAAA	GTCTCCGACCTTCA GTAGGG	Epithelial integrity
TFF3	NM_003226.3	GTGGTTGCTGTTTT GACTCCAG	GGCCACTACCATCAGC AAGAGT	Epithelial integrity
CDH1	NM_001317184.1	GTCCAGCCAATCCT GATGAAAT	TCAGAACCCTCCCT CATAGTC	Epithelial integrity
PTGER4	NM_000958.2	ACCTCTCTGGTGGT GCTCATCT	ATGGGGTTCACAGAAG CAATTC	Epithelial integrity
KGF	NM_002009.3	AATCAAAGGGGTG GAAAGTGAA	TGATGCAGAGGTGTTG TAATGG	Epithelial integrity
MATH-1	NM_005172.1	TGGATGCAGTCGTG GACCTGCA	AGCAGCCCAGCCAGTC CGATT	Transcription Factor
KLF4	NM_001314052.1	AAAAGAACAGCCA CCCACACTT	TCCCAGTCACAGTGGT AAGGTT	Transcription Factor
ELF3	NM_001114309.1	CCCGAAAGCTGAG CAAAGAATA	ATTCATGAGGCCTTC GTTGAG	Transcription Factor
GFI1	NM_001127215.1	GTGAGCCTGGAGC AACACAAG	CGGGTATCCGAGTGAA TGAGTA	Transcription Factor
SOX9	NM_000346.3	CTCAGCAAGACTCT GGGCAAG	GGTACTTGTAATCGGG GTGGTC	Transcription Factor
GLP2R	NM_004246.2	TTCGACTCTTCATC CAGCTGAC	AGTGGCGGGCTAATAA GAAGC	Transcription Factor
GAPDH	NM_001256799.2	CAAGTTCAACGGC ACAGTCAAGG	ACCAGCATCATCACCC CATTGTATCTTG	Reference gene
MAP2K5	NM_001206804.1	TTGTAACACAAGC GGACAGGT	CTTTCGGGTGCCATAT AAGCAT	Reference gene
MAPK6	NM_002748.3	TTAGTCGGGAAGC ACTGGATT	CCGTTGGGAAAGAGTA GATGCT	Reference gene
RPL13A	NM_001270491.1	TCCGAGCCCCAAGC CGCATT	AGCAGGGACCACCATC CGCTT	Reference gene
YWHAZ	NM_001135699.1	TTGGTGTGTGCTGG CGGGGAAT	TGTGCACGCAGACACA CGGTCT	Reference gene

The intestinal epithelium is in constant renewal, from the intestinal stem cells (ISC), residents in the crypts of the intestinal epithelium⁶. The Wnt / β -catenin pathway is one of the fundamental pathways in the differentiation of intestinal cells.

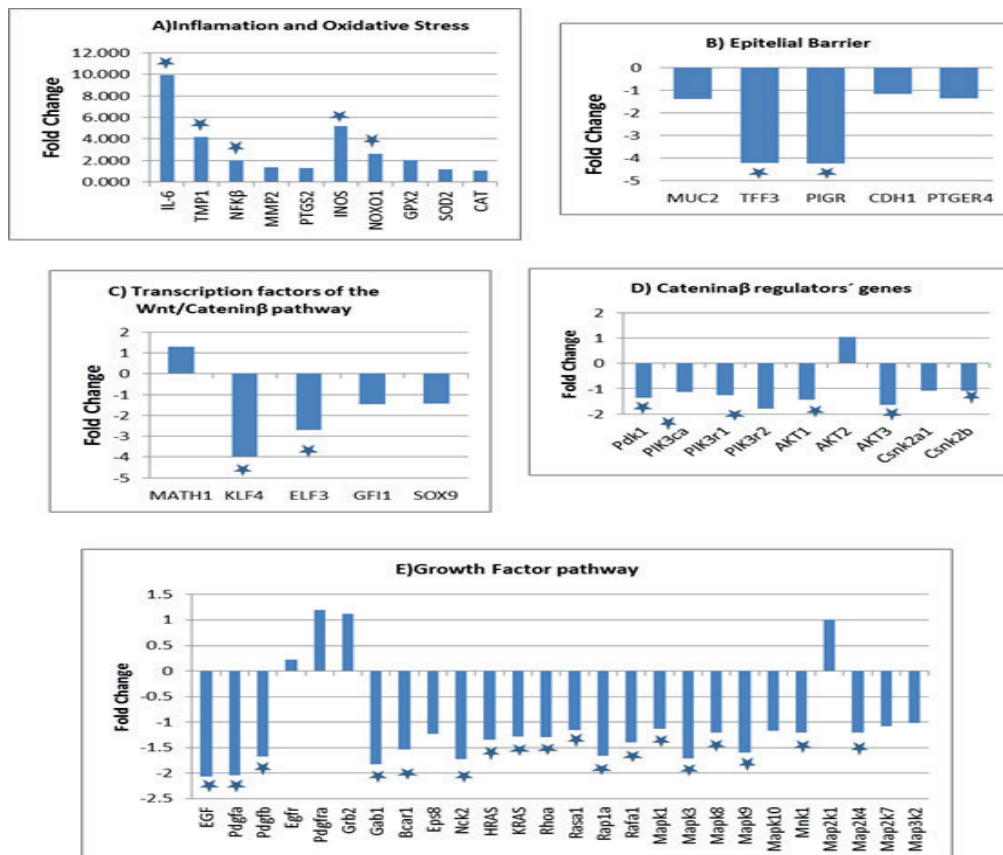
The PI3k / AKT pathway phosphorylates and inactivates the enzyme glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), which is an inhibitor of β -catenin^{7,8}. On the other hand, the CSNK enzyme phosphorylates α -Catenin, forcing it to release β -Catenin⁹. In both cases, β -Catenin accumulates in the cytoplasm and enters the nucleus, activating the Wnt pathway.

Five of the genes analyzed from the PI3K pathway and

the CSNK2B gene showed a statistically significant decrease in expression (Figure 2D), which could imply a decrease in the activation of β -catenin. All this is in correspondence with the statistically significant decrease in the expression of transcription factors of the Wnt pathway, KLF4 and ELF3 (Figure 2C), involved in the differentiation of goblets cells and therefore could explain the decrease in expression of the MUC2 and TFF3 genes, both expressed by goblets cells.

In the process of differentiation, ISCs generate Transit amplifying Cells (TAC), which continue to differentiate into adult intestinal epithelial cells. The TAC compartment also

Figure 2. Level of gene expression in colon biopsies of DSS-induced colitis evaluated by qPCR Data is represented as Log₂ expression ratio of GII (DSS treated) vs GI (control rats). The genes evaluated are related to: A) Inflammation and oxidative stress B) Epithelial barrier formation C) Transcription factors of the Wnt / Catenin β pathway D) Regulator of Catenin β activation E) Pathway of growth factors. Asterisks denote statistically significant changes in expression.



maintains an active proliferation process, which is stimulated through EGF¹⁰.

In general it could be said that the pathway of growth factors is downregulated (Figure 2E), due primarily to the decreased expression of the EGF, PDGFA and PDGFB genes, together with a statistically significant decrease of 6 genes that encode proteins that participate in signal transduction, such as: GAB, BCAR1, EPS8, NCK2 HRAS and KRAS¹⁸⁻²¹. It was also observed a decrease in the expression of most of the analyzed genes of the MAPK family, two of them with statistical significance (MAPK3, MAPK9).

As a whole, all these changes in the expression profile could affect the restitution of the intestinal epithelium and thus favor the development of colitis.

Conclusion

This animal model reproduces colitis at the molecular level, and could be a useful tool in the validation of new therapies against it.

Bibliographic references

1. Rana SV, Sharma S, Kaur J, Prasad KK, Sinha SK, Kochhar R, et al. Relationship of cytokines, oxidative stress and GI motility with bacterial overgrowth in ulcerative colitis patients. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2014, vol 8: 859-865. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crohns.2014.01.007>

2. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, and Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastro-intestinal mucosal diseases. *Physiol Rev*. 2014, vol94: 329-354. DOI:10.1152/physrev.00040.2012
3. Tytgat KM, Opdam FJ, Einerhand AW, Büller HA, Dekker J. MUC2 is the prominent colonic mucin expressed in ulcerative colitis. *Gut*. 1996; 38: 554-563 DOI:10.1136/gut.38.4.554.
4. Aamann L, Vestergaard EM, Grønbaek H. Trefoil factors in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(12):3223-3230. DOI:10.3748/wjg.v20.i12.3223.
5. Johansen F-E and Kaetzel CS. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport. *Mucosal Immunology*. 2011; 4:598-602; DOI:10.1038/mi.2011.37.
6. Barker N, Wetering M and Clevers H. The intestinal stem cell. *Genes Dev*. 2008; 22: 1856-1864. DOI:10.1101/gad.1674008
7. Van der Flier LG and Clevers H. Stem Cells, Self- Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annu. Rev. Physiol*. 2009; 71:241-60. DOI:10.1146/annurev.physiol.010908.163145.
8. Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 in cellular signaling. *Progress in Neurobiology*. 2001, vol65:391-426.
9. Ji H, Wang J, Nika H, Hawke D, Keezer S, Ge Q, Fang B et al (2009) EGF-induced ERK activation promotes CK2-mediated disassociation of alpha-catenin from beta-catenin and transactivation of beta-catenin. *Mol Cell*. 2009; vol 36(4): 547-559.
10. Qi Z, Chen YG. Regulation of intestinal stem cell fate specification. *Sci China Life Sci*, 2015, 58: 570- 578, doi: 10.1007/s11427-015-4859-7.
11. Solomon L, Mansor S, Mallon P, Donnelly E, Hoper M, Loughrey M. et al. The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis :An overview. *Comp Clin Pathol*, 2010, vol 19:235-239. DOI 10.1007/s00580-010-0979-4.

12. Marrero JA, Matkowskyj KA, Yung K, Hecht G, Benya RV 2000 Dextran sulfate sodium-induced murine colitis activates NF- B and increases galanin- 1 receptor expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000, 278:G797–G804.
13. Dharmani P, Leung P, Chadee K. Tum or Necrosis Factor- a and Muc2 Mucin Play Major Roles in Disease Onset and Progression in Dextran Sodium Sulphate-Induced Colitis. *Plos One*, 2011, Vol6(9): e25058. DOI:10.1371/journal.pone.0025058.
14. National Research Council. 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/12910>.
15. Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3. 1998. Available at http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html.
16. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology.* 2002, vol 3(7):research0034.1–0034.11.
17. Arsenescu R, et al. Signature biomarkers in Crohn's disease: toward a molecular classification. *Mucosal Immunol.* 2008; vol 1: 399 – 411.
18. Di Stefano P, Camacho Leal MP, Tornillo G, Bisaro B, Daniele Repetto, Alessandra. The adaptor proteins p140CAP and p130CAS as molecular hubs in migration and invasion of cancer cells. *Am J Cancer Res* 2011; vol 5:663-673.
19. Nishida K and Hirano T. The role of Gab family scaffolding adapter proteins in the signal transduction of cytokine and growth factor receptors. *Cancer Sci* 2003; vol 94: 1029–1033.
20. Marcus L, Pieper J and Janssen O. Nck adapter proteins: Functional versatility in T cells. *Cell Communication and Signaling.* 2009, vol 7:1. DOI: 10.1186/1478-811X-7-1.
21. Mitin N, Rossman KL and Der CJ. Signaling Interplay in Ras Superfamily Function. *Current Biology.* 2005; Vol. 15: R563–R574. DOI 10.1016/j.cub.2005.07.010.

Recibido: 13 January 2018

Aprobado: 15 February 2018

RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

Ventajas del uso del biodiésel B10 (*Ricinus communis*) sobre el Diésel fósil en la protección del medio ambiente

Advantages of the use of biodiesel B10 (*Ricinus communis*) on Diesel fossil in the protection of the environment

Carlos Nolasco Mafla Yépez¹, Juan Carlos García Montoya¹, Marco David Revelo Aldas¹, Erik Paúl Hernández Rueda¹, Ignacio Bayardo Benavides Cevallos¹

DOI. [10.21931/RB/2018.03.02.4](https://doi.org/10.21931/RB/2018.03.02.4)

Abstract: The presence of soot in the environment has been considerably increasing lately according to the World Health Organization. One of the causes of this issue is due to the diesel engines. The study focuses on evaluating the presence of soot on an engine by using fuels such as *Ricinus communis* biodiesel and fossil diesel. The experiment was carried out using a diesel engine test bench Mazda BT50 with CRDi system. In order to run the tests, a BrainBee opacimeter was used. The opacimeter was connected into a probe, which is placed at the end of the car exhaust pipe. The experiment consists of testing the engine for several accelerations such as 1200, 1500, 2000, 2500, 3000 revolutions per minute (RPM) using *Ricinus communis* biodiesel and fossil diesel. Once all the accelerations are completed, the opacity difference was obtained to make a comparative analysis from the highest to the lowest opacity, resulting as the average percentage of opacity, which is the result that should be followed according to the established norms. It was observed 80% of reduction in diesel engine opacity with the use of *Ricinus communis* biodiesel comparing to fossil diesel.

Keywords: Biodiesel, Mazda BT 50 CRDi, Opacimeter, Soot, RPM.

Resumen: La presencia de el hollín en el ambiente ha aumentado considerablemente según la Organización Mundial de la Salud. Uno de los causantes de esta problemática son los motores diésel. El objetivo del presente estudio es evaluar el hollín que se emite de un motor diésel utilizando biodiésel de Ricino y diésel. Las pruebas se realizaron en un banco de motores diésel Mazda BT50-CRDi. Para realizar las mediciones se utilizó un opacímetro de marca BrainBee. El opacímetro está conectado a una sonda que se coloca en el tubo de escape, la cual transporta los gases al equipo. La prueba consiste en someter al motor a varias aceleraciones como son 1200, 1500, 2000, 2500, 3000 revoluciones por minuto (RPM) con el biodiésel y con el diésel fósil. Una vez completado todas las aceleraciones, se obtiene la diferencia de opacidad, básicamente sirve para realizar un análisis comparativo de la opacidad mayor con la menor, resultando un promedio porcentual de opacidad, que es el que se debe regular según las normas establecidas. Se notó una reducción del 80% de opacidad en motores diésel con el uso de biodiésel a partir de aceite de Ricino en comparación al diésel fósil.

Palabras clave: Biodiésel, Mazda BT50 CRDi, Opacímetro, Hollín, RPM.

Introducción

Las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) (NO_x, CO₂, CO, HC) son los causantes de provocar el calentamiento global, el deterioro del ambiente y la salud de los seres humanos¹. Se puede notar que con el pasar del tiempo existe una mayor concentración en la atmósfera terrestre por la globalización y las actividades antrópicas². Según la Organización (2014) Meteorológica Mundial, la concentración del CO₂ se ha elevado en un 41% en los últimos 10 años.

El motor diésel juega un papel importante en la producción industrial moderna y ofrece el funcionamiento eficiente, económico y fiable que se han reconocido en el transcurso de los años. Recientemente, China uno de los países más contaminados del mundo ha planteado una exigencia de emisiones más severa para el motor diésel, y está alineándose con el estándar Euro IV, PM y NO_x en las emisiones generadas por el motor diésel³.

Es así como el ambiente se ha visto afectado por estas emisiones que son producto principalmente de la combustión de combustibles fósiles en motores a gasolina y diésel⁴. Se conoce que el parque automotor de vehículos con motor a gasolina y diésel va en aumento, siendo estos últimos los responsables de

la emisión de partículas de hollín al ambiente⁵. Por otro lado, a parte de los gases de efecto invernadero (GEI) existen otras afectaciones ambientales producto de la combustión interna de motores que causan en la salud de los seres vivos problemas respiratorios y de piel.

El hollín, la ceniza y el polvo son partículas relativamente pesadas que se depositan en el suelo, y el aire las limpia rápidamente⁶. Sin embargo, cerca de su fuente de origen constituyen con frecuencia un peligro para la salud, ya que pueden causar enfermedades respiratorias crónicas tales como el enfisema y el cáncer⁷. Las emisiones de los motores de combustión afectan seriamente al medio ambiente y la salud humana. El calentamiento global está aumentando debido a los gases de efecto invernadero, provocado por los mismos.

Existen combustibles alternativos como el biodiésel de carbón neutro, que se debe tomar en cuenta como mecanismo para reducir las emisiones de gases contaminantes que se producen en la combustión⁸. Aún existe debate sobre el uso de biodiésel que provocan dificultades al momento de su uso por las mezclas que se utilizan, y dependiendo de dichas mezclas

¹ Universidad Técnica del Norte, Carrera de Ingeniería Automotriz, Grupo de investigación BICER, Ciudadela Universitaria Av. 17 de julio 5-21 y General José María Córdova sector El Olivo, CP. EC100150 Ibarra-Ecuador

las respectivas modificaciones del motor⁹, siendo el objetivo de este estudio, es evaluar la presencia de hollín en un motor a diésel utilizando biodiésel de Ricino y diésel fósil bajo diferentes regímenes del motor.

En la actualidad existen varios procesos de transesterificación para la producción de biodiésel. Los aceites vegetales tienen propiedades que permiten poder manipular su densidad y viscosidad, siendo adecuados para la producción de biodiésel¹⁰. La transesterificación es el proceso químico de aceites vegetales que se utiliza alcohol con la combinación de un catalizador que puede ser hidróxido de potasio o hidróxido de sodio, para romper las moléculas del aceite vegetal en ésteres de etilo o metilo, obteniendo glicerina como subproducto y así poder separar el aceite y la glicérica¹¹. En la producción de biodiésel, se realiza el proceso de evaporación del agua, donde se somete el combustible a una temperatura de 100 °C para evaporar el agua utilizada en el lavado y poder obtener el Biodiésel que cumplan con las normas ASTM D 7467^{12,13}. Luego se mezcla el biodiésel preparado con diésel fósil en la concentración de (B10) para la fabricación de mezclas de biodiésel a ser utilizado en el motor diésel CRDi para la realización de pruebas de motores.

Al utilizar biodiésel se logra disminuir las emisiones de CO y CO₂ presentes en la combustión debido a que una molécula de biodiésel contiene entre 12 y 18 carbonos, y una molécula de diésel puede contener hasta 20 carbonos^{14,15}. En el motor diésel la combustión se origina al comprimir el aire a presiones y temperaturas elevadas. Cuando el inyector entrega el diésel a la cámara, este ocasiona una auto ignición instantánea, al no poder oxidar toda la mezcla, el motor emite al ambiente hollín¹⁶, en altas cantidades este gas puede ser nocivo para los humanos¹⁷.

En el Ecuador el parámetro de medición se detalla en el Instituto Ecuatoriano de Normalización en la norma técnica NTE INEN 2 202:2000, donde manifiesta que "Los límites máximos de opacidad de emisiones para fuentes móviles con motor de diésel es: a partir del año 2000 en adelante, el 50% de opacidad y los modelos posteriores al año 2000 es el 60% de opacidad"¹⁸.

A nivel internacional la normativa de opacidad para vehículos con motores diésel indica que no debe superar el 40% del coeficiente de absorción de luz (4 m^{-1})¹⁹. El sistema de inyección de combustible en un motor diésel de inyección directa es alcanzar un alto grado de atomización para mejorar la penetración de combustible con la intención de utilizar la máxima cantidad de aire y para fomentar la evaporación en un corto tiempo y alcanzar una mayor eficiencia de combustión²⁰.

Materiales y métodos

Para analizar la opacidad de los gases de escape se utilizó un banco de pruebas experimentales de motores diésel marca Mazda BT50 año 2013, el cual tiene una potencia de 157,30 HP a 3500 RPM y un torque de 363 Nm a 1800 RPM, 4 cilindros con un sistema de inyección directa electrónica CRDi (Common Rail Diésel Injection), cabe recalcar que para la experimentación no se hizo modificaciones al motor.

Para el estudio de opacidad de gases de escape en el motor mencionado se utilizó un opacímetro marca Brain Bee, modelo Opa 100, que permite la medición en base al principio de reducción de la intensidad de la luz que se utiliza para determinar el porcentaje de opacidad, que es la unidad de medición que determina el grado de opacidad de las emisiones de escape de una fuente móvil a diésel²¹.

Los combustibles que se utilizaron son el biodiésel procedente del aceite de ricino conocido como aceite de higuera y

el diésel fósil del mercado. Para el caso del biodiésel se realizó una mezcla de B10 (10% biodiésel y 90% diésel fósil).

Las pruebas con los combustibles se desarrollaron en el mismo motor, tomando precauciones como la limpieza del sistema de inyección al momento de realizar cada una de las pruebas, con el fin de tener condiciones óptimas para la experimentación.

Las mediciones se realizaron cuando el motor llegó a una temperatura de 80°C, dicha temperatura se mide al aceite del motor, por medio de un termómetro que se conecta al opacímetro. Cuando se cumple esta condición, se procede a preparar el opacímetro con una función automática. Luego, se realiza una prueba para comprobar que la sonda no tenga fugas, estado que se denomina auto cero. Concluyendo con estos procedimientos se introduce la sonda al tubo de escape y se realiza las pruebas en diferentes revoluciones del motor²².

El opacímetro cuenta con valores de medición que van desde 0 a 99,9% de opacidad, que consiste en evaluar la cantidad de hollín que pasa por un rayo de luz, y así conocer el porcentaje de opacidad que emite el motor diésel, de igual manera se puede testar con el coeficiente de absorción luminosa por metro (K a m^{-1}). Para tener una correcta medición, es necesario que los gases de escape cuenten con una temperatura mínima de 20 °C y una máxima de 400 °C.

Para realizar la prueba de opacidad con los diferentes combustibles, se realizan 7 repeticiones a diferentes revoluciones como son 1200 RPM, 1500 RPM, 2000 RPM, 2500 RPM y 3000 RPM, esto para simular el comportamiento de diferentes estados del motor. Una vez que se obtiene los datos de opacidad en cada aceleración, se tiene la diferencia de opacidad que es la comparación de la unidad mayor con la menor, y para obtener el porcentaje de opacidad se calcula la media de todos los datos obtenidos.

Resultados

Como se observa en la figura 1, el porcentaje de opacidad aumenta cuando las RPM del motor se incrementan. Esto se debe a que a mayores revoluciones existe un mayor consumo de combustible y por ende una mayor cantidad de combustible no quemado, ocasionando así mayor cantidad de hollín. La norma NTE INEN 2 202:2000, exhibe que para este tipo de vehículo el límite de opacidad es de 50%.

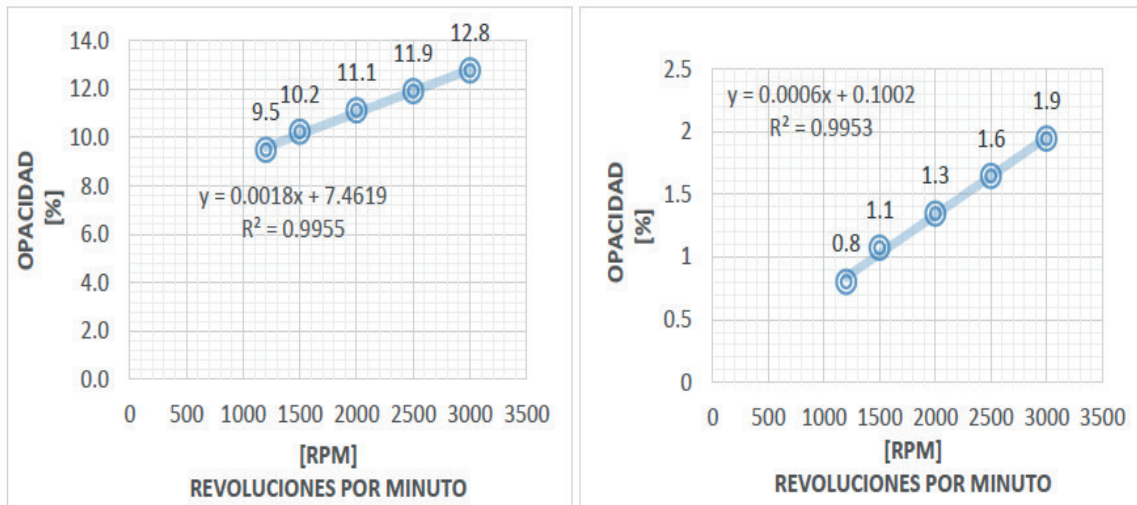
La conducción eficiente pasa siempre por mantener una marcha lo más regular posible aprovechando la inercia que el vehículo ha adquirido²³. Una velocidad de crucero muy recomendable a este respecto se mantiene normalmente alrededor de los 2000 RPM teniendo engranada, por supuesto, la última velocidad hacia adelante. En este punto se suele dar el hecho de mantener el par máximo en el mínimo número de revoluciones, zona en la que se encuentra el menor consumo de combustible posible²⁴.

Analizando la línea de tendencia se obtienen las ecuaciones para calcular la opacidad de motores a diésel y biodiésel según las RPM del motor, donde la opacidad a bajas revoluciones del motor (ralentí) sería de 0,5% y a altas revoluciones (corte de inyección) 2,8%.

Discusión

En la figura 1 se observa los resultados de opacidad utilizando los combustibles diésel fósil y biodiésel. Se tomaron en cuenta los mismos parámetros para ambos combustibles,

Figure 1. Comparación del porcentaje de opacidad diésel y B10



$$Opa_{DF} = [0,0018(RPM) + 7,4619] \quad (1)$$

Donde,

Opa: Opacidad Diésel Fósil

RPM: Revoluciones del motor

$$Op_{B10} = [0,0006 \times (RPM) + 0,1002] \quad (2)$$

Donde,

Op_{B10}: Opacidad Biodiésel

RPM: Revoluciones motor

evidenciando que para el diésel fósil el porcentaje de opacidad aumenta en rangos considerables en un 11,1% (Media) a diferencia del B10 en un 1,34% (Media). Tomando en cuenta que el banco de pruebas es electrónico, este motor está por debajo de los límites de opacidad exigidos por las normas nacionales.

Analizando los resultados se tiene que a 1200 RPM se obtiene 9,5% de opacidad y a 3000 RPM 12,8% de opacidad. Considerando todos los datos se calcula un promedio del porcentaje de opacidad de 11,1% para diésel fósil. En lo que respecta a la línea de tendencia para el combustible diésel fósil, se demuestra como lineal por lo que la opacidad es proporcional a las RPM del motor, como se observa la ecuación 1 para diésel fósil y la ecuación 2 para B10.

Comparando las líneas tendenciales entre los combustibles B10 y diésel fósil una determinada diferencia en el porcentaje de opacidad, que emiten los vehículos con motores diésel. Analizando el incremento de opacidad en cada RPM es mayor en comparación con B10 de la misma manera al aumentar las RPM se eleva el porcentaje de opacidad, pero se

puede observar la diferencia en la línea de tendencia donde en las mismas RPM el aumento de opacidad es menor. Se observa que al aumentar 500 RPM el motor con el uso de diésel fósil aumenta 9 puntos de opacidad en cada prueba, y con el uso de B10 aumenta 3 puntos de opacidad disminuyendo un 80% las emisiones de hollín en el motor. Analizando la opacidad a mayores revoluciones donde su presencia es mayor se puede concluir que con el uso de B10 se disminuye un 85% de opacidad a 3000 RPM. Estos datos se evidencian en base a la tendencia que se genera.

Analizando los resultados obtenidos se puede concluir que con el uso de biodiésel de aceite de higuera (Ricino común), disminuye considerablemente la presencia de partículas de hollín en gases de escape de los motores diésel.

Tomando en cuenta los parámetros cuando el motor es más eficiente a 2500 RPM, se determinó que la opacidad con B10 es 1,6%, resaltando así que la emisión de hollín es baja comparada con el diésel fósil, de esta manera se puede decir que la mezcla B10 disminuye considerablemente en 80 veces

la contaminación de hollín en un motor a diésel con esas características.

Conclusiones

Analizando los datos obtenidos en las pruebas con uso de B10 y diésel fósil se llegó a la conclusión que con el B10 se puede lograr una disminución del 80% de opacidad en los motores a diésel con esas características, esto se debe a la disminución de partículas de carbón en el biodiésel y esto contribuye a que se oxide mejor la mezcla combustible aire.

A mayores revoluciones del motor mayor consumo de combustible y por ende acrecienta la formación de hollín, tomando en cuenta las condiciones óptimas de funcionamiento del motor que está en el rango de 2500 RPM, se concluye que con el uso de B10 se disminuye 10 veces la presencia de hollín.

Aplicando las ecuaciones obtenidas en el estudio tanto para B10 como diésel fósil se puede obtener la opacidad según las revoluciones a las que trabaje el motor.

Como se puede apreciar los motores diésel electrónicos CRDi cumplen con la normativa establecida en el Ecuador, ya que no superan los límites de opacidad con ninguno de los combustibles utilizados, pero la presencia de menos cantidad de hollín en el ambiente contribuye a la conservación del mismo.

Según la Organización Mundial de Salud el hollín emitido por los vehículos diésel son los una de las causas de enfermedades cancerígenas en los pulmones de los humanos, donde las partículas más pequeñas de hollín son las más críticas, pero con la utilización de biodiésel se podría mitigar este problema.

Referencias bibliográficas

1. Zambrano G, Rossi C. y Hernandez J.: "Emisión de gases en vehículos experimentales diesel-biodiesel". Universidad del Valle Guatemala, Vol. 12, No. 5 (2014) 64-67.
2. Udiel D. y Solano M.: "Contaminación por emisiones vehiculares sector residencial linda vista sur, distrito número dos de managua, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua, 2013.
3. Zhen Z. y Jing L.: "Effects of Exhaust Post-treatment Technology on Diesel Engine Emissions". Proceedings 2011 International Conference on Transportation, Mechanical, and Electrical Engineering, (2011) 1804-1807.
4. Jiaqiang E., Minhieu P., Zhao D., Yuanwang D., DucHieu L., Wei Z., Teng L., Qingguo P. y Zhiqing Z.: "Effect of different technologies on combustion and emissions of the diesel engine fueled with biodiesel: A review". Renewable and Sustainable Energy Reviews, Vol. 80, (2017) 620-647.
5. Delgado A., Chaparro W. y Silva J.: "Influencia del porcentaje de mezcla del aceite de higuera en la obtención de combustible alternativo para motores diesel". Revista Facultad Ingeniería Universidad Antioquia, Vol. 5, (2011) 45-52.
6. J. Azjargal, «The Comparison of Combustion Characteristic and Performances of Diesel Engine Fueled with Biodiesel and Diesel Blends". International Forum on Strategic Technology, Vol. 9, (2014) 313-316.
7. Organización Mundial de la Salud.: "Calidad del aire ambiente (exterior) y salud". OMS, Ginebra, 2016.
8. Honig V., Strouhal J. y Linhart Z.: "Biodiesel from waste animal fat: efficient fuel of the future". International Advances in Economic Research, Vol. 25, (2016) 465-477.
9. Imtenan S., Varman M., Masju H., Kalam M., Sajjad H., Arbab M. y Rizwanul I.: "Impact of low temperature combustion attaining strategies on diesel engine emissions for diesel and biodiesels:

- A review". Energy Conversion and Management, Vol. 80, (2014) 329-356.
10. Aalam C., Saravanan G. y Kannan M.: "Experimental investigations on a CRDI system assisted diesel engine fuelled with aluminium oxide nanoparticles blended biodiesel". Alexandria Engineering Journal, Vol. 70, No. 3, (2015) 351-358.
 11. Rojas A., Girón E. y Torres H.: "Variables de operación en el proceso de transesterificación de aceites vegetales: una revisión -catálisis química". Ingeniería e Investigación, Vol. 30, No. 1, (2009) 17-22.
 12. Senila L., Miclean M., Cadar O., Senila M., Kovacs M. y Hoaghia A.: "Validation of a method for determination of free glycerol in biodiesel". Studia Universitatis Babeş-Bolyai. Chemia., Vol. 15, (2016) 345-348.
 13. Maksimuk Y., Buglak A., Kruk V. y Antonova Z.: "Rheological properties of residual fuel oil containing fuel blends with bioadditives. Part 1. Rapeseed oil based bioadditives". Chemistry and Technology of Fuels and Oils, Vol. 9, (2013) 108-115.
 14. Amaris J., Manrique D. y Jaramillo J.: "Biocombustibles líquidos en Colombia y su impacto en motores de combustión interna". El Reventón Energético, (2015) 23-34.
 15. Karlsson H., Ahlgren S., Sandgren M., Passoth V., Wallberg O. y Hansson A.: "A systems analysis of biodiesel production from wheat straw using oleaginous yeast: process design, mass and energy balances". Biotechnology for Biofuels, Vol. 34 (2016) 356-378.
 16. Agudelo J., Agudelo A. y Pérez J.: "Análisis energético y exergético de un motor diesel de automoción operando en diferentes altitudes". Revista Facultad Ingeniería Universidad Antioquia, Vol. 8, (2009) 45-54.
 17. Lalvani J., Kirubhakaran K., Parthasarathy M. y Sabarish R.: "Performance Characteristic and Emission Analysis of a Single Cylinder Diesel Engine Operated on Blends of Diesel and Easte Cooking Oil". 2013 International Conference on Energy Efficient Technologies for Sustainability, (2013) 781-785.
 18. Instituto Ecuatoriano de Normalización, Gestión ambiental, Aire, Vehículos automotores.: "Determinación de la opacidad de emisiones de escape de motores de diesel mediante la prueba estática. Método de aceleración libre". Quito, INEN, 2000.
 19. Asociación americana de testeo de materiales.: "Densidad del humo de gases de escape de la combustión". ASTM internacional, EEUU, 2013.
 20. Syed A., Saravanan C. y Anand P.: "Impacto de la alta presión de inyección de combustible de las características del motor CRDI diesel alimentado por mahua mezcla de ésteres de metilo". Ingeniería Térmica Aplicada, Vol. 106, (2016) 702-711.
 21. Brain Bee.: "OPA 100 Opacimetro para motores diésel". Parma Italia: Brain Bee S.p.A, 2010.
 22. Globaltech.: "Opacimetro Brain Bee Opa100". (2016). [En línea]. Available: <http://globaltechla.com/equipos-de-taller/34-opacimetro-opa-100.html#.WHK9mFN97IU>.
 23. Institution of Mechanical Engineers, "Internal Combustion Engines: Improving Performance, Fuel Economy and Emission". London: Woodhead Publishing, 2011.
 24. Castro V.: "El motor diésel en el automóvil". CEAC, Barcelona, 2000.

Recibido: 9 noviembre 2017

Aprobado: 2 enero 2018

RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

Comparación de los Niveles de Concentración de Ozono Troposférico y Dióxido de Nitrógeno en Ecuador y Otras Latitudes.

Comparison of tropospheric ozone and nitrogen dioxide concentration levels in Ecuador and other latitudes.

Manuel A. Andino-Enríquez¹, Sandra P. Hidalgo-Bonilla¹, Luis A. Ladino^{2,*}

DOI. 10.21931/RB/2018.03.02.5

Resumen: En las décadas recientes, los problemas relacionados con la actividad antropogénica han generado preocupación debido a la acumulación de contaminantes en el aire, dando como resultado cambios en las concentraciones de gases de efecto invernadero y el material particulado. En Ecuador y el resto del mundo, la contaminación atmosférica representa un riesgo y una amenaza para la salud y el medio ambiente. Para realizar un análisis sobre esta temática es necesario realizar un proceso dinámico, seguido de un esfuerzo permanente que permita para mejorar la calidad de la información. Los estudios realizados en Ecuador sobre emisiones de contaminantes se realizan desde 2010; sin embargo, no se ejecutan comparaciones sobre de este tema en el contexto mundial, lo que conduce a que no se pueda realizar una apreciación real de la situación de la calidad del aire en el país, así como las consecuencias que pueden conducir no hacerlo. De esta manera, surge el principal objetivo de este proyecto que es analizar los niveles de concentración de NO₂ y O₃ en Ecuador y realizar una comparación directa con distintas ciudades alrededor del mundo. Dando como resultado que la concentración de los gases de estudio varía con el número de la población de un sector además de la contaminación que esta produce. Para desarrollar la presente investigación se ha recolectado información que proviene de la Organización Mundial de Meteorología, pertenecientes a WHO WDCGG DATA SUMMARY (World Meteorological Organization World Data Centre for Greenhouse Gases) del año 2015, mientras que los datos de las ciudades de estudio de Ecuador (Ibarra y Quito) fueron proporcionados por el municipio de Ibarra y por el Municipio del Distrito Metropolitano de Quito.

Palabras clave: Contaminación antropogénica, dióxido de nitrógeno, ozono troposférico, concentración de gases atmosféricos.

Abstract: In recent decades, problems related to anthropogenic activity have generated concern due to the accumulation of pollutants in the air, resulting in changes in the concentrations of greenhouse gases and particulate matter. In Ecuador and the rest of the world, air pollution represents a risk and a threat to health and the environment. To carry out an analysis on this subject, it is necessary to develop a dynamic process, followed by a permanent effort that allows improving the quality of the information. The studies developed in Ecuador on pollutant emissions are carried out since 2010; however, there are no comparisons made on this issue in the global context, which leads to the inability to make a real assessment of the air quality situation in the country, as well as the consequences that may result from not doing it. Thus, the main objective of this project is to analyze the concentration levels of NO₂ and O₃ tropospheric in Ecuador and make a direct comparison with different cities around the world. Resulting that concentration of study gases varies with the number of the population of a sector in addition to the pollution that it produces. In order to develop this research, the information collected comes from the World Meteorological Organization, belonging to WHO WDCGG DATA SUMMARY (World Meteorological Organization World Data Center for Greenhouse Gases) of the year 2015, while the data of the study cities of Ecuador (Ibarra and Quito) were provided by the municipality of Ibarra and by the Municipality of the Metropolitan District of Quito respectively.

Keywords: Anthropogenic pollution, nitrogen dioxide, tropospheric ozone, concentration of atmospheric gases.

Introducción

En las últimas décadas, los problemas de contaminación debido al desarrollo de actividades humanas han conllevado a un incremento en la concentración de gases de efecto invernadero en la atmósfera del planeta. La contaminación atmosférica implica cambios en las características físicas, químicas y biológicas de los componentes atmosféricos lo cual puede perjudicar la salud y supervivencia de los seres vivos¹.

La superficie de la Tierra ha tenido grandes cambios naturales de temperatura durante los últimos 10000 años, los cuales inclusive superan los valores actuales. Sin embargo, desde la Revolución Industrial (1750) se ha dado un incremento continuo y descontrolado del calentamiento de la superficie de la Tierra debido al alza de la concentración de gases de efecto de invernadero como resultado de la contaminación antropogénica².

El sol es la mayor fuente de radiación que recibe la Tierra, esta es transmitida por ondas electromagnéticas. Cuando la radiación solar entra en contacto con la atmosfera terrestre, parte de esta radiación es absorbida por la superficie terrestre y posteriormente es reemitida como radiación infrarroja (IR). Una fracción de la radiación solar y de la radiación IR es absorbida por los componentes atmosféricos lo que resulta en un incremento de la temperatura del planeta. De igual manera, parte de la radiación solar es reflejada de regreso al espacio por las nubes, partículas de aerosol, la atmósfera y por la misma superficie terrestre lo que resulta en un enfriamiento de la superficie terrestre³. Con el fin de mantener una temperatura y clima estable, la Tierra debe tener un equilibrio energético entre la radiación que recibe desde el Sol y la radiación IR que emite hacia el espacio. A este equilibrio se lo conoce como

¹ Escuela de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad de Investigación de Tecnología Experimental YachayTech, Urcuquí, Ecuador

² Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

temperatura efectiva⁴. Cuando la radiación IR emitida por la Tierra es atrapada (absorbida) por gases de efecto invernadero es irradiada de vuelta a la superficie terrestre, resultando en el calentamiento de esta. Este fenómeno es conocido como efecto invernadero⁴. La captura de radiación terrestre por gases de efecto invernadero es esencial para mantener una temperatura de la superficie terrestre sustentable para la vida, ya que de no ser así la temperatura de la Tierra se encontraría cerca del punto de congelamiento -18°C ⁴. El problema surge debido a la contaminación antropogénica ya que la emisión descontrolada de gases de efecto invernadero puede inducir a un calentamiento más rápido de la superficie de la Tierra y actualmente, los esfuerzos por reducir su velocidad o su magnitud han dado resultados moderados pero no han conseguido revertir los cambios ambientales adversos⁵.

Los gases de efecto invernadero más comunes son: Dióxido de carbono (CO_2), Ozono troposférico (O_3), Vapor de agua, y Metano (CH_4). Debido a las actividades humanas, sus concentraciones se han visto incrementadas⁶. El ejemplo más tangible lo reporta el CO_2 como se ilustra en la Figura 1.

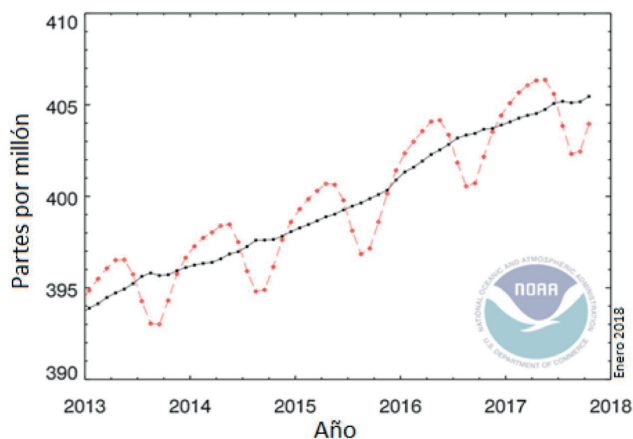


Figura 1. Incremento de la concentración de CO_2 con el tiempo ⁷.

Dióxido de Nitrógeno (NO_2)

El dióxido de nitrógeno es un gas tóxico, no inflamable de color rojizo. Es un compuesto químico constituido por dos átomos de oxígeno y un átomo de nitrógeno. El dióxido de nitrógeno no es un gas de efecto invernadero, pero en la atmósfera contribuye a la formación fotoquímica del ozono troposférico, además de ser uno de los mayores enemigos de las ciudades ya que envenena a sus habitantes como se explica a continuación⁸. Los óxidos de nitrógeno (NO_2 y NO) son creados a partir de rayos, la actividad microbiana del suelo, quema de biomasa (tanto naturales como incendios antropogénicos) al igual que la combustión de derivados de petróleo⁹.

El NO_2 se genera principalmente en el aire quemando combustible a partir de emisiones de automóviles, camiones, autobuses, plantas de energía, entre otros. Junto con otros NO_x , el gas NO_2 reacciona con otros productos químicos en el aire para formar tanto O_3 troposférico y material particulado (PM)¹⁰.

Debido a la contaminación humana mencionada anteriormente, se ha producido un incremento de las concentraciones de NO_2 , principalmente en los sectores urbanos e industriales¹¹. El ciclo diario del NO_2 empieza en las primeras horas del día donde la máxima concentración se observa entre las 8 y 9 de la mañana. Seguidamente, como este gas es un precursor del ozono troposférico, reacciona químicamente en presencia

de radiación solar ($290\text{ nm} < \lambda < 400\text{ nm}$) con otros gases, contribuyendo a la formación de O_3 troposférico, reduciendo su concentración en la atmósfera. Según vaya disminuyendo la intensidad de la radiación solar, la concentración de O_3 troposférico disminuirá y la concentración de NO_2 volverá a aumentar (8-9 pm), pero este pico de concentración no es tan elevado como el máximo en las primeras horas de la mañana¹².

El dióxido de nitrógeno produce un gran riesgo en el medio ambiente, ya que se oxida fácilmente en el vapor de agua de las nubes formando ácido nítrico (HNO_3), uno de los principales constituyentes de la lluvia ácida¹¹. Las gotas de lluvia que contienen estos ácidos, al precipitarse reaccionan fácilmente con sustancias orgánicas e inorgánicas y las modifican, perjudicando o destruyendo el suelo, agua, plantas, animales y edificios¹³. La precipitación de lluvia ácida logra sustraer nutrientes esenciales del suelo y liberar aluminio, lo que dificulta la absorción de agua por parte de los árboles. Asimismo, también dañan las agujas de las coníferas y las hojas de los árboles¹⁴.

Los efectos perjudiciales del NO_2 en la salud humana se centran en el aparato respiratorio. Según la Consejería de Sanidad de la Región de Murcia, se ha comprobado que el NO_2 provoca daños al parénquima pulmonar. Además, determina la inhibición de la depuración mucociliar, la fagocitosis y la respuesta inmunológica en el pulmón, produciendo una disminución de la resistencia del pulmón ante las infecciones. Igualmente, incrementa la sensibilidad pulmonar a los broncoconstrictores, afectando, por lo tanto, especialmente a las personas asmáticas¹⁵.

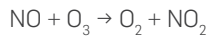
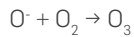
La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció el valor guía de 20 ppb ($40\ \mu\text{g m}^{-3}$) perteneciente a la media anual de NO_2 , todo esto para proteger a la población de los efectos negativos de este gas en la salud (Valor guía: valor numérico relacionado con la concentración de partículas presentes en el aire que indica que, si este es sobrepasado, existe la posibilidad de poseer efectos adversos en la salud). El fundamento de esto es debido a que la mayoría de los métodos de reducción de la concentración son específicos para los NO_x (NO_2 y NO) y no están concebidos para controlar otros contaminantes que los acompañan aumentando sus emisiones¹⁶.

Ozono Troposférico (O_3)

El ozono es un gas incoloro, cuya fórmula molecular es O_3 , se encuentra en dos capas de la atmósfera: en la estratósfera y en la tropósfera. El ozono en la estratósfera actúa como una capa protectora contra los efectos negativos en la salud y el medio ambiente, ya que es capaz de absorber la radiación ultravioleta emanada del Sol evitando así que llegue a la superficie terrestre¹⁷. De la concentración total de ozono presente en la atmósfera, en la tropósfera se encuentra menos del 10%. Sin embargo, el ozono troposférico juega un rol importante en el ambiente debido a su participación en diferentes procesos químicos. Entre el espacio geográfico comprendido por el Trópico de Cáncer (20°N) y el Círculo Polar Ártico (60°N), el ozono troposférico fue el mayor contribuyente del calentamiento global durante el siglo XX².

El ozono troposférico es un contaminante secundario, esto significa que no se emite directamente a la atmósfera, sino que es el resultado de reacciones químicas, en condiciones adecuadas de radiación solar acompañada de otros contaminantes primarios como: compuestos orgánicos volátiles (COV), monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrógeno (NO_x), y en menor medida de metano (CH_4). Uno de los mecanismos de formación es a través de la interacción entre la radiación solar $\lambda < 400$ y NO_2 producen. Esta interacción produce O^{\bullet} , el

mismo que actúa como intermedio en la reacción. Esta especie química reacciona con O_2 y produce O_3 troposférico¹⁸. De igual manera es su destrucción, el O_3 troposférico reacciona con NO formando O_2 y NO_2 bajando la concentración de O_3 en la atmósfera¹⁹.



El ciclo diario de este contaminante comienza durante las primeras horas de la mañana, en las que comienzan las actividades antropogénicas, emitiendo principalmente: NO_x , CH_4 y CO_2 . Seguidamente, mientras el planeta recibe radiación solar, la concentración de ozono va aumentando según la presencia de los compuestos que lo forman. Ya en horas de la tarde, la radiación solar no es tan intensa provocando que la concentración de ozono troposférico disminuya hasta regresar a su concentración base¹².

El ozono troposférico se origina principalmente en las áreas urbanas por varias fuentes de emisión (automóviles y la industria). Las concentraciones elevadas de ozono troposférico provocan que este gas reaccione rápidamente destruyendo o alterando otras moléculas y posteriormente actúa como un contaminante tóxico, causando muchos problemas para la salud humana (daños respiratorios y pulmonares, dolores de pecho, etc.)¹².

La exposición al ozono se ha relacionado con la mortalidad prematura y una gama de cuestiones de morbilidad y síntomas de asma²⁰. La OMS estableció el valor guía de niveles de concentración de ozono en $100 \mu\text{g m}^{-3}$ para un promedio diario de ocho horas; sin embargo, los datos recolectados no son suficientes para recomendar un valor guía anual. La unidad de medida que se utiliza en este trabajo de investigación es ppb (partes por billón), el valor guía presentado equivaldría a 50 ppb¹⁶.

Recopilación de datos

La Global Atmosphere Watch (GAW) es un programa de la Organización Meteorológica Mundial (WMO) que posee un centro de datos que archiva y proporciona observaciones de la composición química de la atmósfera, su cambio natural y antropogénico gracias a las más de 400 estaciones de monitoreo alrededor de todo el mundo²¹.

Ibarra es la capital de la provincia de Imbabura. Está ubicada al norte de Ecuador, específicamente a 115 km al noroeste de Quito, a 125 km al sur de la ciudad de Tulcán, con una altitud de 2225 m.s.n.m. Según el censo nacional de población realizado en el 2010, Ibarra posee una población aproximada de 181175 habitantes. Posee una variedad de climas con un promedio de temperatura de 18°C , estos van desde el frío de las elevaciones andinas, pasando por el cálido húmedo de la zona de Lita y la Carolina, hasta el tropical seco del valle del Chota²².

La ciudad de Ibarra se encuentra dentro de dos subcuencas hidrográficas: Río Chorlaví y Río Tahuando. La topografía de su suelo corresponde a pendientes que oscilan entre el 5 y el 15% en las estribaciones del cerro Imbabura²². La actividad industrial de la ciudad de Ibarra está conformado por: la industria manufacturera, la construcción, la minera, y la energética. Esta última se centra en la producción de electricidad, de gas y de agua²³. En relación a la actividad vehicular, cada año se da

un incremento de el 8% hasta 11% de el número de vehículos de circulan la ciudad²⁴.

Quito es la capital política de la Republica de Ecuador, actualmente cuenta con 2644145 habitantes, se encuentra a 2700 m.s.n.m. La ciudad se encuentra ubicada principalmente sobre el valle de Quito, formando parte de la Hoya de Guayllabamba. Su clima corresponde al clima subtropical de tierras altas, van desde climas áridos y templados hasta húmedos y fríos. Quito se divide en 3 zonas: sur, centro, y norte; donde el sur es el lugar más frío de la ciudad ya que es la zona más alta, el centro es caliente; donde se dan siempre las temperaturas más altas, y el norte es templado. Quito, siendo la capital de la República del Ecuador, alberga la mayor cantidad de industrias del país, constituyéndose en una de las principales fuentes de desarrollo del país. Esto ha provocado serios impactos ambientales en la ciudad y consecuentemente problemas en la salud de sus habitantes²⁵. En el año 2014, el parque automotor de la ciudad de Quito fue de 468777 vehículos. Los niveles de ocupación de los vehículos han disminuido de 1.7 personas en el 2013 a 1.2 personas en el año 2014, lo que representa un incremento en la congestión vehicular de la ciudad²⁶. En este momento, existen 10450 empresas instaladas en la capital ecuatoriana, de las cuales 372 son industrias y se encuentran ubicadas en zonas urbanas. Debido a este problema, se está realizando reordenamiento de parques y zonas industriales, con el objetivo de que las empresas se ubiquen en un sector específico, mediante la creación de tres parques industriales. Las industrias en la ciudad de Quito se relacionan con productos estructurales, maquinaria pesada para el sector eléctrico, el sector agrícola, la construcción, los textiles, industrias metalmeccánicas, etc²⁷.

Materiales y métodos

La WHO WDCGG (World Meteorological Organization World Data Centre for Greenhouse Gases) DATA SUMMARY del año 2015 pertenecientes a la Organización Mundial de Meteorología (WMO), proporcionó los datos de las concentraciones de NO_2 y O_3 de las diferentes estaciones que posee, con el fin de ayudar al desarrollo de este trabajo de investigación. Además, el Municipio de la ciudad de Ibarra y la Secretaria de Ambiente del Municipio del Distrito Metropolitano de Quito facilitaron los datos de sus respectivas ciudades.

La selección de las estaciones de la GAW se realizó con la finalidad de poder elaborar una comparación directa de la concentración de NO_2 y O_3 de las estaciones ecuatorianas con distintas ciudades de alrededor del mundo cubriendo diferentes latitudes y longitudes.

Se realizó una selección del tiempo de estudio mediante una revisión de los datos proporcionados por las diferentes instituciones, verificando que en el tiempo seleccionado existan datos de Ecuador, de las ciudades de estudio (no todas las estaciones pertenecientes a la (WMO) poseen datos recientes de concentraciones de gases de efecto invernadero) y que posea el mayor tiempo de duración posible. Lo anterior dio como resultado que el tiempo de estudio sea desde enero del 2013 hasta diciembre del mismo año para el NO_2 , mientras que para O_3 troposférico el periodo de estudio fue entre abril del 2013 y septiembre del 2014. Una vez obtenidas las ciudades de estudio y los datos de concentraciones de gases de interés, se procedió a recopilar información acerca de su población con la finalidad de poseer una visión más general de la capacidad de emisión de contaminantes atmosféricos. Mediante la formulación de hipótesis, finalmente se realizó la comparación de

Figura 2. Mapa de las estaciones de O_3 troposférico en Ibarra.



la concentración de los gases de estudio y la población de las ciudades de estudio, obteniendo así los siguientes resultados.

La Figura 2 muestra la ubicación de las estaciones en la ciudad de Ibarra, ellas están ubicadas en las afueras y en el centro de la ciudad. La distancia más corta entre estaciones es de aproximadamente 2 km, mientras que la distancia más lejana es de 4 km aproximadamente. Lamentablemente los datos proporcionados por el Municipio de Ibarra no detallan los equipos utilizados para la toma de datos de O_3 troposférico.

Resultados

Dióxido de Nitrógeno

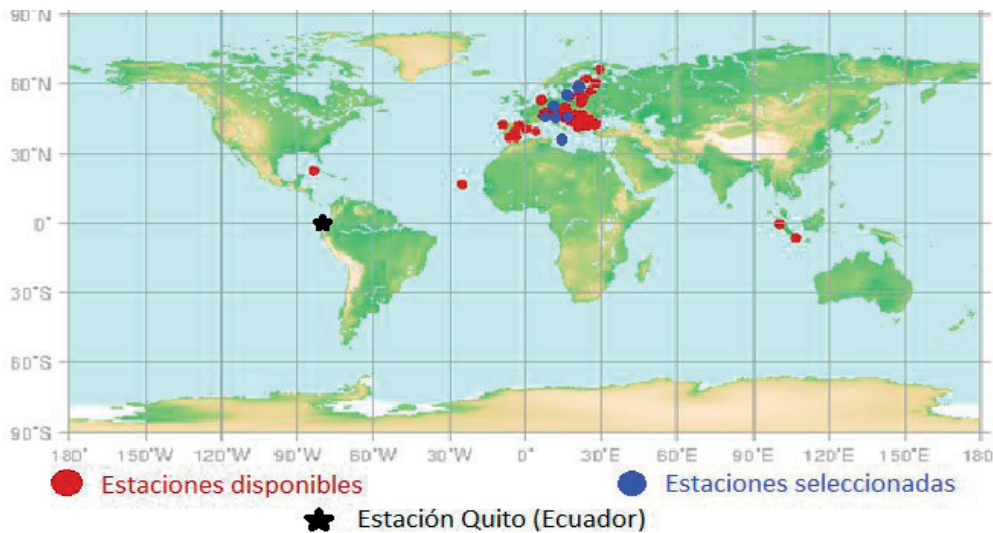


Figura 3. Estaciones de NO_2 seleccionadas².

La Figura 3 muestra las estaciones seleccionadas para el dióxido de nitrógeno. Las marcas en rojo representan todas las estaciones disponibles de NO_2 de la WDCGG (World Data Centre for Greenhouse Gases). De estas estaciones se seleccionaron las estaciones para el estudio de este gas (marcas en azul). Con la excepción de que la estación de Ecuador (Quito e Ibarra) que no es parte de la WDCGG. Las hipótesis planteadas fueron:

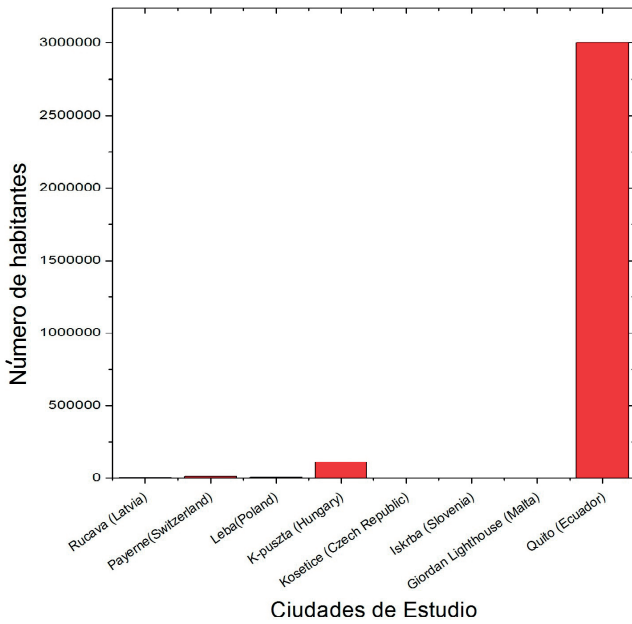
Las corrientes de aire influyen la concentración de dióxido de nitrógeno de una ciudad/región.

La concentración de dióxido de nitrógeno es proporcional al aumento de la población de una ciudad/región.

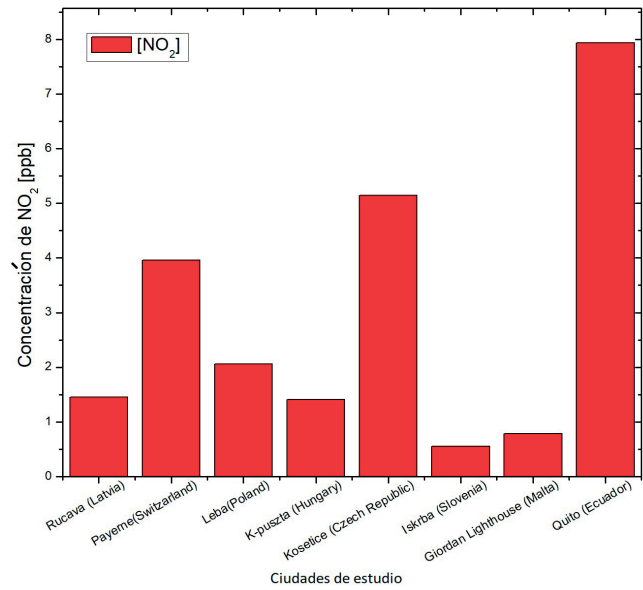
Como se puede apreciar en la Figura 3, Entre estas estaciones escogidas, se encuentran las de ciudades de los siguientes países: Latvia, Suiza, Polonia, Hungría, República Checa, Eslovenia, Malta y Ecuador.

Tal como se puede apreciar en la Figura 4, la ciudad de Quito posee la densidad de población más elevada de las ciudades de estudio, en concordancia con los niveles de NO_2 , los cuales son los más altos (Figura 5 y Tabla 1). Uno de los principales motivos de este nivel de concentración es debido a la densidad poblacional que existe en esta ciudad y por la contaminación que produce (contaminación vehicular e industrial principalmente), como también se lo puede apreciar en las diferentes ciudades en donde la densidad poblacional es alta (ciudad de Guayaquil, en 2017 estimó una población de 2644891 habitantes)²⁹. Esto indica que la densidad poblacional es directamente proporcional al nivel de concentración de NO_2 .

Otro factor que influye en la concentración de este gas son las corrientes de viento. Las corrientes de aire influyen en la dispersión de los contaminantes, específicamente la dirección y velocidad del viento. La concentración de contaminantes es inversamente proporcional a la velocidad del viento. La dispersión de contaminantes en la atmósfera está influenciada por la dirección del viento. Si la dirección del viento es constante, la misma área estará continuamente expuesta a niveles relativamente altos de contaminación. Si la dirección del viento varía, las concentraciones resultarán relativamente menores debido a que los contaminantes serán dispersados sobre un área mayor³⁰. Debido a estos motivos, las concentraciones de un contaminante pueden variar por: densidad poblacional, corrientes de aire, topografía, altitud, radiación solar, altura de la



Ciudades de Estudio



Nota: El gráfico de barras representa un promedio de concentración desde enero de 2013 hasta el mes de diciembre del mismo año.

Figura 4. Población en las ciudades de estudio para NO₂²⁸.

Figura 5. Comparación de la concentración de NO₂ en las estaciones seleccionadas.

Estaciones	Promedio de Concentración de NO ₂ (ppb)	Desviación Estándar
Rucava	1.45212766	0.7366
Payeme	3.958156028	1.7789
Leba	2.061170213	0.6061
K-pusztza	1.404833333	0.5284
Kosetice	5.141843972	1.7148
Iskrba	0.556028369	0.2653
Giordan Lighthouse	0.785505319	0.7855
Quito	7.935436126	1.0798

Tabla 1. Desviación estándar de la concentración de NO₂ y O₃ en cada estación de estudio.

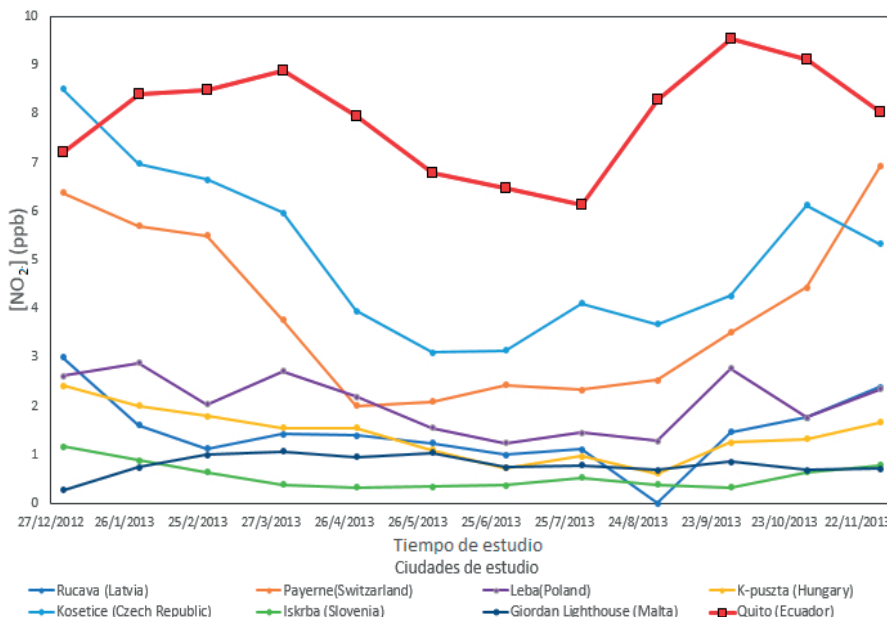


Figura 6. Comparación de niveles de NO₂ en Ecuador con otras latitudes, año 2013

Nota: Cada punto en la gráfica hace referencia a promedios mensuales

de estudio produce una considerable emisión de NO_2 independientemente del número de habitantes que esta posee, como por ejemplo la ciudad de Kosetice (República Checa) que tiene poca densidad de población (Figura 4) pero produce una alta cantidad de NO_2 que emana a la atmósfera. La línea de tendencia de la ciudad de Quito muestra valores más bajos a mitad de año y los valores más altos al final e inicio de año. Esto es debido a que a mitad de año existe más radiación en Ecuador por lo que, el NO_2 con la radiación solar forman O_3 troposférico, bajando la concentración de NO_2 presente en la ciudad de Quito. Por lo contrario, a final e inicio de año, la radiación solar no es tan intensa en comparación a los meses de mitad de año, lo que permite que no se produzca tanto O_3 troposférico, subiendo la concentración de NO_2 .

Según la OMS, los niveles permitidos de concentración de dióxido de nitrógeno corresponden a $40 \mu\text{g m}^{-3}$ (21.27 ppb), por lo que la concentración de dióxido de nitrógeno en la ciudad de Quito está por debajo del valor límite según los estándares de la OMS. Sin embargo, según los datos obtenidos, la concentración de este gas en la ciudad de Quito es la más alta de todas, por lo que se recomienda reducir la quema de biomasa (tanto naturales como incendios antropogénicos) al igual que la quema de combustibles ya que estas actividades son muy probablemente las principales responsables del nivel de concentración de este gas.

Ozono troposférico

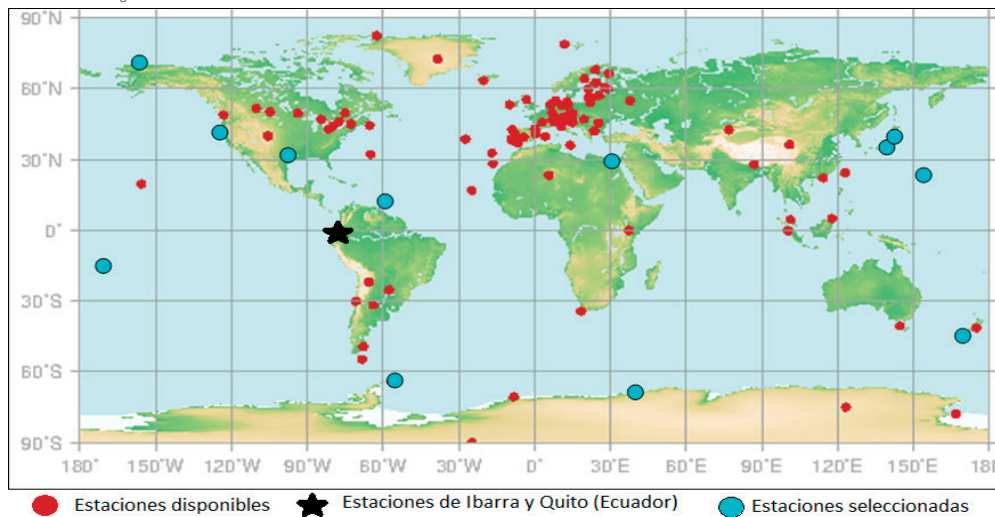
Al igual que durante el análisis de la concentración de NO_2 , primeramente, se presentará las estaciones seleccionadas para el análisis de este gas de efecto invernadero.

A diferencia del dióxido de nitrógeno, para el análisis del

Se puede observar en la Figura 8 que la población de El Cairo supera por mucho a las demás ciudades. La Figura 9 y Tabla 2 muestra que las concentraciones de ozono troposférico de EL Cairo son mucho menores a lo esperado, tomando en cuenta su población (muy alta) y su posición geográfica (propensa a una alta radiación solar). La concentración de este gas en Ecuador es la más baja de todas las ciudades de estudio a pesar de que, sumando la población de las dos estaciones ecuatorianas, son la segunda más alta población entre las ciudades de estudio (Figura 8).

La Figura 10 muestra las mediciones mensuales de este gas de efecto invernadero de las estaciones escogidas durante el tiempo de estudio. Sin embargo, algunas estaciones no cuentan con datos a partir del mes de febrero debido a que en esa fecha suspendieron sus actividades. Las tendencias de concentración de O_3 troposférico de las estaciones ecuatorianas muestran los valores más bajos de las diferentes ciudades analizadas. Esto es algo sorprendente dada la su ubicación geográfica. Ecuador recibe altos niveles de radiación solar con muy pocas fluctuaciones a lo largo del año debido a su Latitud. Sin embargo, la radiación solar no es el único componente necesario para la formación de O_3 troposférico. De estos datos se puede concluir que la concentración de precursores de O_3 (COVs, NO_x , y aerosoles orgánicos secundarios o SOA) es muy baja o que es mucho menor que en las otras ciudades estudiadas. Respecto a las diferentes estaciones estudiadas, no existe una clara tendencia anual del O_3 . Esto debido a que las ciudades de estudio se encuentran ubicadas a diferentes Latitudes, donde dependiendo de la época del año reciben más o menos radiación. En el caso de Ecuador se observa una concentración cuasi constante de 10 ppb.

Figura 7. Estaciones de O_3 troposférico seleccionadas.



de ozono troposférico se contó con una estación adicional en Ecuador, la estación de Ibarra.

Igual que en la Figura 3, en la Figura 7 las marcas en azul son las estaciones que se utilizaron para el análisis de ozono troposférico. Las hipótesis planteadas para este gas son las siguientes:

· Mientras la población de una ciudad/región aumente, incrementará la concentración de Ozono Troposférico.

· La concentración de Ozono Troposférico será más alta en una ciudad/región si esta recibe una mayor radiación solar.

Tendencias de O_3 en Ibarra

La Figura 11 representa a la concentración de O_3 troposférico de la ciudad de Ibarra donde cada línea representa una estación de dicha ciudad. La tendencia de todas líneas de concentración de O_3 troposférico están muy relacionadas entre sí, aunque se puede notar algunas diferencias entre ellas, las cuales pueden ser debido a un incremento en la actividad antropogénica en el sector donde se encuentra la estación de estudio. En el mes de agosto de 2013 y en el mes de agosto del 2014 se encuentra un incremento en la concentración del gas de estudio probablemente debido a un aumento en la radiación solar en la ciudad de Ibarra, lo que explica que las líneas de

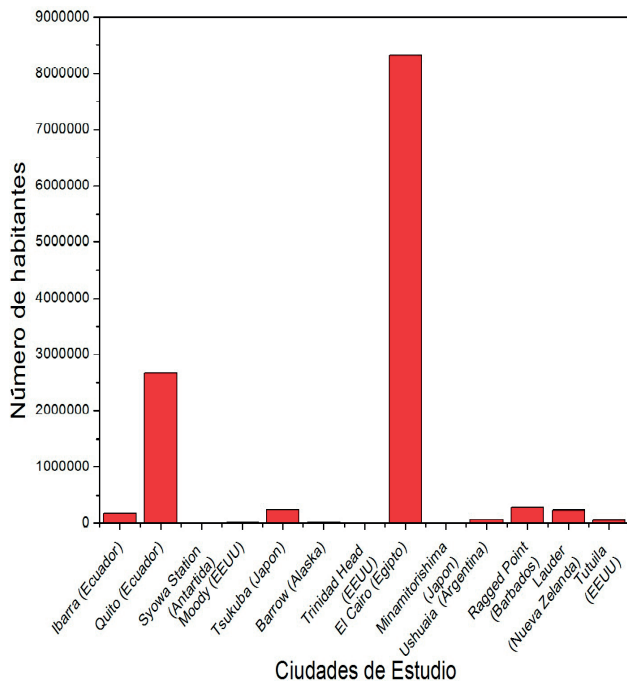


Figura 8. Coblaciones en las diferentes ciudades de estudio²⁸.

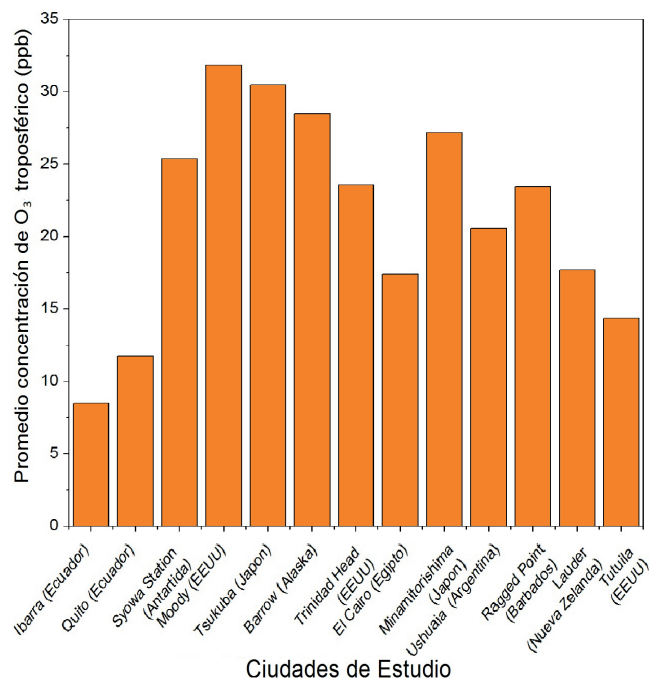


Figura 9. Promedio de Concentración O₃ de troposférico en las ciudades de estudio.

Estación	Promedio concentración O ₃ troposférico (ppb)	Desviación estándar
Ibarra	8.50	5.4037
Quito	11.72	2.7678
Syowa Station	25.34	7.5212
Moody	31.85	3.5982
Tsukuba	30.47	8.4660
Barrow	28.48	5.8622
Trinidad Head	23.57	3.9847
El Cairo	17.37	9.6961
Minamitorishima	27.17	13.5452
Ushuaia	20.54	4.9282
Ragged Point	23.41	5.0043
Lauder	17.71	3.8685
Tutulia	14.36	4.1540

Tabla 2. Desviación estándar de la concentración de O₃ troposférico en cada estación de estudio.

tendencia de todas las estaciones poseen un ascenso en su valor durante los meses mencionados.

Debido a que las estaciones de la ciudad de Ibarra no se realizan la medición de radiación solar, se usaron los datos de radiación solar de la ciudad de Quito asumiendo que este valor no varía mucho entre ambas ciudades. Sin embargo, cabe notar que las dos ciudades se encuentran separadas por una distancia de 116 km y que la altura de Ibarra y Quito son 2215 y 2700 m.s.n.m., respectivamente. El r^2 (0.0032) encontrado en este análisis indica que la radiación solar no es el factor determinante en la formación de O₃ troposférico en Ibarra. Esto debido a que sus valores son relativamente constantes a lo largo del año, día tras día. Es muy probable que quienes con-

trolen la formación y concentración de O₃ son sus precursores. Desafortunadamente, el único precursor que se mide en Ibarra es el NO₂ el cual tampoco muestra una buena correlación con O₃ troposférico ($r^2 = 0.0136$).

La Oscilación Madden-Julian (MJO, por sus siglas en inglés) consiste en patrones a gran escala acoplados en la circulación atmosférica y la convección profunda. Estas se propagan lentamente hacia el este ($\sim 5 \text{ m s}^{-1}$) a través de la porción de los océanos Índico y Pacífico donde la superficie del mar es cálida. La MJO interactúa constantemente con el océano subyacente e influye en muchos sistemas meteorológicos y climáticos³¹. Las concentraciones de ozono troposférico se pueden ver disminuidas o aumentadas por la MJO; sin embargo, dada la falta de estudios en esta dirección en Ecuador, no se puede afirmar que la MJO tiene un efecto directo en los niveles de O₃ en Ibarra.

Tendencias de O₃ en Quito

Como se mencionó anteriormente, la cantidad de radiación solar puede afectar la concentración de ozono troposférico, por lo que las siguientes ilustraciones se basarán en la relación de estos dos factores. Para el caso de Quito el r^2 (0.4793) encontrado muestra que la radiación solar posee relación en la formación de O₃ troposférico en esta ciudad. La cantidad de radiación solar se adapta de una manera adecuada con la concentración de O₃ troposférico, generando una posible tendencia. Al igual que en Ibarra se encontró que el dióxido de nitrógeno a pesar de ser un precursor de ozono troposférico no es un factor que influye de gran medida ya que su r^2 (0.0045) es muy bajo.

Según la OMS, existe un valor fijo en las directrices de ozono troposférico de 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de media en 8h equivalente a 50 ppb, lamentablemente no existe un valor anual reportado por la OMS para este gas³². A pesar de la ausencia de este dato, varias instituciones otorgan valores aproximados en el cual 60 ppb de valor objetivo año no debe ser superado para la protección de la salud humana³³.

Siguiendo este dato y la Figura 9, la concentración de

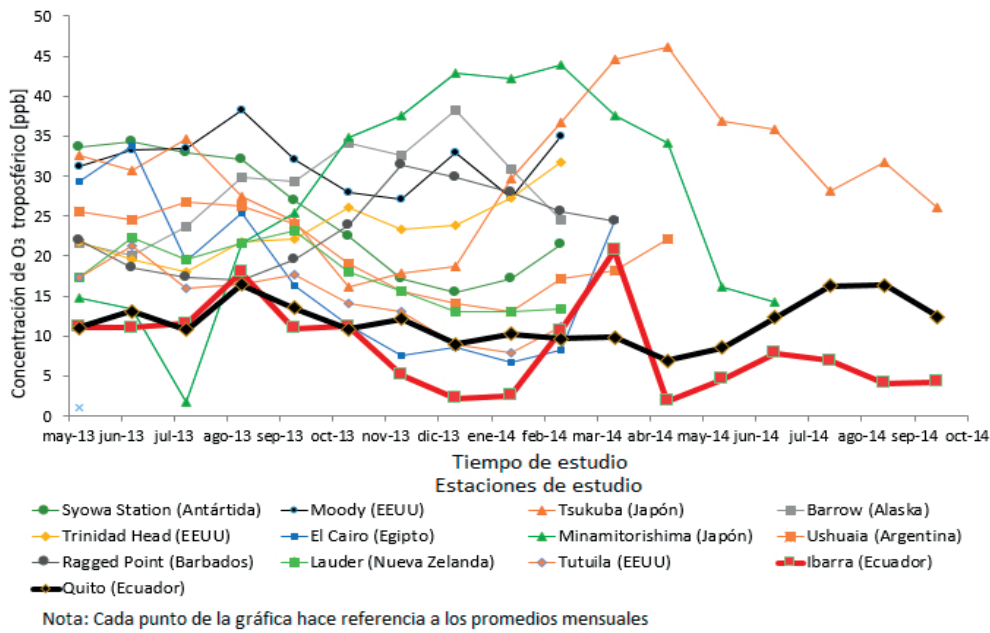


Figura 10. Comparación de niveles de concentración de O_3 troposférico en Ecuador y las ciudades de estudio, año 2013.

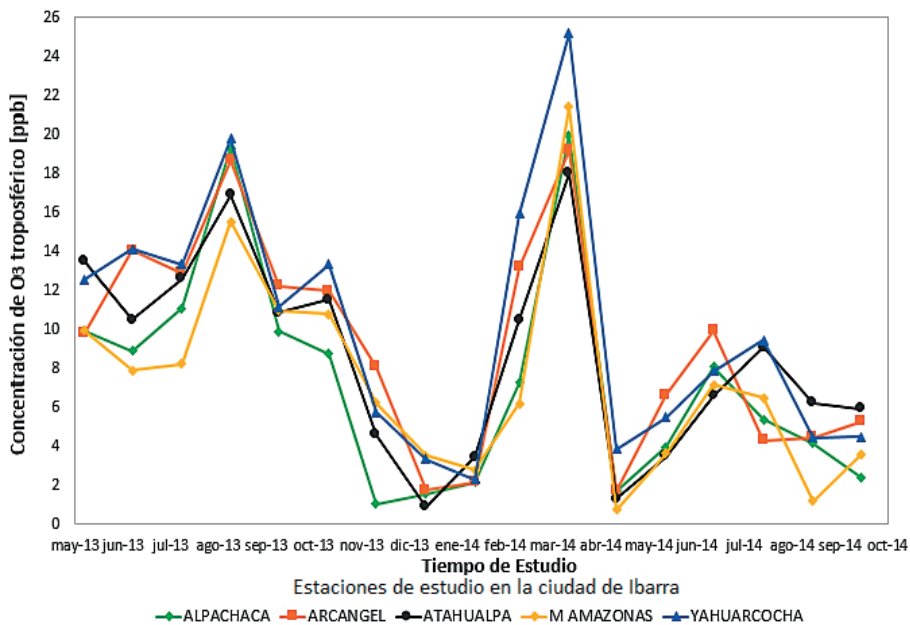


Figura 11. Mediciones de O_3 troposférico en la ciudad de Ibarra

ozono troposférico de las dos estaciones en Ecuador (Quito e Ibarra) se encuentra bajo el valor permitido. Sin embargo, se recomienda que, no solo las autoridades ayuden a reducir la concentración de este gas, sino a la comunidad en general debido a que, por más que se encuentre bajo el valor autorizado, puede ser perjudicial para la salud humana.

Conclusiones y recomendaciones

Con estas consideraciones se concluye en el presente trabajo de investigación que quienes controlan la formación y concentración de O_3 son sus precursores. Desafortunadamente, el único precursor que se mide en Ibarra y Quito es el NO_2 el cual no muestra una buena correlación con O_3 troposférico. La cantidad de radiación solar también es un factor que influye en

la concentración de ozono troposférico; sin embargo, aunque se encontró una buena correlación con los niveles de O_3 en Quito, este no parece ser quien controle los niveles de O_3 . Es necesario poder medir los demás precursores del O_3 para poder entender sus fuentes y la influencia de estos en la calidad del aire local.

Los niveles de concentración de dióxido de nitrógeno y ozono troposférico en las dos estaciones de Ecuador (Quito – Ibarra) poseen valores por debajo a los permitidos según la Organización Mundial de la Salud y la Dirección General de Sostenibilidad y Control Ambiental respectivamente, por lo que, la calidad de aire de Ecuador cuenta con valores adecuados en concentración de NO_2 y ozono troposférico en comparación de las diferentes ciudades tomadas en cuenta para este estudio.

Según los resultados obtenidos en la presente investigación, para la concentración de NO_2 sí existe una influencia del

número de habitantes de la ciudad/región ya que una población mayor producirá un aumento de contaminación. Tomando el mismo factor (número de habitantes), la concentración de O₃ troposférico no se ve influenciada por la población de un sector, ya que el principal factor de influencia en la concentración de este gas es la cantidad de radiación solar reportada. Por último, las concentraciones de ambos gases se pueden ver alteradas por densidad poblacional, corrientes de aire, topografía, altitud, radiación solar, altura de la capa de la mezcla³⁰.

A pesar de que, como ya se mencionó, las concentraciones de NO₂ y ozono troposférico se encuentran por debajo de los permitidos según la ONU, se recomienda que las industrias y la sociedad en general tomen conciencia sobre la gran problemática de la contaminación atmosférica ya que está en nuestras manos que las siguientes generaciones puedan gozar de un aire limpio y consecuentemente una calidad de vida digna como todos nos merecemos. De igual manera, se recomienda que los municipios y los gobiernos propongan mejoren el monitoreo tanto de gases como de partículas atmosféricas para tener una mejor incertidumbre sobre la calidad del aire que respiramos y de esta manera generar leyes que permitan reducir la emisión de estos contaminantes.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Global Atmosphere Watch por proveer gran parte de los datos que fueron usados en este estudio. De igual manera se agradece el apoyo económico por parte de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM a través del proyecto PAPIIT IA108417.

Bibliografía

1. Silva Arroyave SM, Correa Restrepo FJ. Análisis de la contaminación del suelo: revisión de la normativa y posibilidades de regulación económica. *Semest Económico* 2009; 12: 13-34.
2. Centro mundial de datos para gases de efecto invernadero. WMO WDCGG DATA SUMMARY. 39th ed. Japan Meteorological Agency: Tokyo, 2015.
3. Restrepo C. ¿Cómo el deshielo del Ártico afecta el desarrollo ambiental y humano? *Col. MARYMOUNT*. 2014; : 28.
4. Jacob D. Introducción a la Química Atmosférica. Princeton University: Princeton, 1999.
5. United Nations Environment Programme. GEO5 (Global Environment Outlook). Nairobi, 2012.
6. Fox S. The Top Ten Greenhouse Gases. *Pop. Sci.* 2009.
7. National Oceanic and Atmospheric Administration. Recent Global Monthly Mean CO₂. *Glob. Monit. Div.* 2018.
8. Martín B. Qué es el dióxido de nitrógeno y por qué afecta tanto a la salud y el medio ambiente. *D. La Inf.* 2016.
9. U.S. Greenhouse Gas Inventory Program. Greenhouse Gases and Global Warming Potential Values. Washington D. C., 2002.
10. United State Environmental Protection Agency. Basic Information about NO₂. Nitrogen Dioxide Pollut.
11. Fundación Crana. Óxidos de nitrógeno (NOX = NO + NO₂). *Fund. Crana.* .
12. IDEAM. OZONO TROPOSFÉRICO. .
13. Universidad Complutense de Madrid. Lluvia ácida. .
14. Redacción National Geographic. Lluvia ácida. *Natl. Geogr. Mag.* 2010.
15. Consejería de Salud de la Región de Murcia. Dióxido de Nitrógeno. *Cons. Salud la Región Murcia.* .
16. Organización Mundial de la Salud. Guías de calidad del aire de la OMS relativas al material particulado, ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre. 2005.
17. GreenFacts. Ozono. *GreenFacts.* .
18. González Kirchner B. Ozono troposférico. 2009.
19. Consejería de Sanidad y Consumo de la Región de Murcia. El ozono troposférico y sus efectos sobre la salud. *Cons Sanid y Consum la Región Murcia;* : 26.
20. Secretariado de la Comisión para la Cooperación Ambiental. Ozono troposférico. El mosaico América del Norte Panor los Probl Ambient más Relev.
21. Organización Mundial de Meteorología. GAW stations network and other measurements. *Glob. Atmos. Watch.* .
22. Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal San Miguel de Ibarra. Ibarra, ciudad a la que siempre se vuelve. .
23. Gobierno Autónomo Descentralizado de San Miguel de Ibarra. PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DEL CANTÓN IBARRA. .
24. Bolaños C. Cada año aumenta un 8 % el parque automotor en Ibarra. 2016.
25. Rosero M. Actividades profesionales y comercios hacen que Quito sea la capital económica. *El Comer.* 2014.
26. Pacheco M. 50 000 automotores nuevos circulan en las vías de Quito. *El Comer.* 2014.
27. Redacción Quito. La nueva zona industrial de Quito empieza a edificarse. *Rev. Líderes.* 2013.
28. Population.City. Poblaciones de países y ciudades en todo el mundo. *Population.City.* .
29. Instituto Nacional de Estadística y Censos. Guayaquil en cifras. .
30. Venegas LE, Mazzeo NA. LA VELOCIDAD DEL VIENTO Y LA DISPERSIÓN DE CONTAMINANTES EN LA ATMÓSFERA. .
31. Zhang C. Madden-Julian Oscillation. Miami, Florida, USA, 2005.
32. World Health Organization. Ambient (outdoor) air quality and health. *World Heal. Organ.* 2016.
33. Dirección general de sostenibilidad y control ambiental. Calidad del Aire 2016. 2016.

Recibido: 20 febrero 2018

Aprobado: 21 mayo 2018



RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

Análisis de comunidades bacterianas asociadas a la rizósfera de especies vegetales *Miconia zamorensis* y *Erato polymnoides* en suelos contaminados por metales pesados.

Bacterial community analysis associated to rhizosphere plant species of *Miconia zamorensis* and *Erato polymnoides* in heavy metals polluted soils.

Manuel Alexander Rojas¹, Oscar Amable Vivanco Galván²

DOI. 10.21931/RB/2018.03.02.6

Resumen: En ciertos ecosistemas contaminados, varios microorganismos como las bacterias pueden mejorar la producción de biomasa y la tolerancia de las plantas frente a metales pesados como condiciones de estrés. En este contexto el presente estudio busca la identificación y comparación de las comunidades bacterianas que se encuentran asociadas a especies vegetales (i.e. *Miconia zamorensis* y *Erato polymnoides*) mediante el empleo de las técnicas moleculares: PCR y secuenciación de Sanger. Las bacterias se obtuvieron a partir de aislamientos a partir de muestras de suelo de la rizósfera contaminados por metales pesados. El análisis molecular se basó en la amplificación de una región parcial del ARNr 16S. El análisis filogenético evidenció que los microorganismos aislados pertenecen a tres géneros: *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Serratia* los cuales son géneros de bacterianas con capacidad PGPR (plant growth promoting rhizobacteria). Con esta información se contribuye al conocimiento de la diversidad cultivable de microorganismos, así mismo a futuro puede ser usada en proyectos para biorremediar suelos contaminados.

Palabras Claves: Herramientas moleculares, 16S ARN ribosomal, rizobacterias PGPR.

Abstract: Polluted ecosystems has several microorganisms such as bacteria can improve biomass production and tolerance to heavy metals and stress condition. In this context, the present study is focus in the identification and comparison of the bacterial communities associated to vegetal species (i.e. *Miconia zamorensis* and *Erato polymnoides*). The bacterial isolates were obtained from rhizosphere of polluted heavy metal soils. Molecular analysis was based on the amplification of a partial region of 16S rRNA. The phylogenetic analysis reveal that the isolated microorganisms belong to three genera: *Bacillus*, *Lysinibacillus* and *Serratia*, members of PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) bacteria. This information contribute to the knowledge bacterial fraction cultivable, in the future the information can be used in bioremediation projects.

KeyWords: Molecular characterization, 16S rRNA, bioremediation, rhizobacteria, PGPR.

Introducción

En Ecuador la actividad minera artesanal de pequeña escala genera un alto grado de contaminación ambiental, sobre todo aquella relacionada con la extracción de oro, ya que la extracción de este mineral requiere del uso de metales pesados como mercurio, plomo y sustancias químicas como cianuro, ácido sulfúrico, entre otros¹, los mismos que causan contaminación de todos los ecosistemas contiguos².

Además, como consecuencia de la actividad humana, se generan concentraciones elevadas de metales pesados residuales en el suelo³, los cuales son difícilmente biodegradados y por lo tanto se acumulan en el medio ambiente⁴, causando cambios en la composición, biomasa y actividad de las comunidades microbianas, lo que resulta en efectos adversos sobre la salud de las plantas, limitando el crecimiento vegetal, la cobertura vegetal, y la calidad de los cultivos⁵. También ejercen un efecto perjudicial en la cadena alimenticia de varias especies y causan la muerte de muchos animales que consumen plantas con un alto contenido de metales pesados³. Adicionalmente, la contaminación de las cadenas alimenticias y las fuentes de agua, tiene efectos adversos sobre la salud humana, ya que muchos de estos metales pesados y metaloides son tóxicos y pueden causar efectos no deseables y problemas severos, incluso a bajas concentraciones⁴.

Los desechos de la minería se han convertido en una grave

problema en todo el mundo que incrementa cada vez más con la industrialización y que requiere atención inmediata⁴. Actualmente las nuevas tecnologías como la biorremediación, apuntan al uso de especies vegetales y microorganismos rizosféricos para remover, contener o retener contaminantes, convirtiéndose en una alternativa de bajo costo y con enormes ventajas ambientales, haciéndola de gran interés en todo el mundo para recuperar suelos contaminados por metales pesados^{4,6}.

La fitorremediación es una nueva tecnología promisoría que implica el uso de plantas que tienen la capacidad para mejorar el suelo y/o la calidad del agua mediante la inactivación o la translocación de los contaminantes en los diferentes órganos de la planta sin efectos negativos en la actividad biológica, estructura y fertilidad del suelo⁷. Sin embargo, el éxito de la fitorremediación también depende de las asociaciones beneficiosas entre los microorganismos del suelo (como las bacterias de la rizósfera) y las plantas, en donde la planta proporciona una fuente de carbono para las bacterias, y a su vez, las bacterias son capaces de producir ciertas sustancias o metabolitos, que promueven el crecimiento de la planta, la cual ayuda a disminuir el impacto negativo de la toxicidad por metales pesados⁷. Las bacterias también pueden actuar sobre estos contaminantes, a través de la bioacumulación,

¹ Ecología y Evolución de Sistemas Microbianos. Departamento Ciencias Biológicas. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador

inmovilización o removiéndolos más fácilmente del ambiente a través de la quelación de metales y la subsecuente eliminación mediante la secreción de exopolisacáridos^{8,9}.

En base a toda esta problemática, el presente proyecto busca la identificación y comparación de las comunidades bacterianas asociadas a la rizósfera de especies vegetales *Miconia zamorensis* y *Erato polymnoides*.

Con esta información, a futuro, se podrá trabajar en aplicaciones biotecnológicas que incluyan el uso de consorcios microbianos con capacidad de biorremediar zonas contaminadas.

Methods

Obtención de aislados bacterianos.

Para el desarrollo del presente proyecto de investigación, la colección de bacterias de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) proporcionó aislados bacterianos para la identificación molecular correspondientes a dos áreas de muestreo: zona uno corresponde al vertedero de desechos mineros (contaminado) se eligieron cepas obtenidas de la rizósfera de *Miconia* y *Erato* (24 cepas por especie vegetal); la zona dos (control) es un sitio ubicado a 50 metros, de donde se emplearon cepas bacterianas de *Miconia* y *Erato* (24 cepas por especie vegetal);. El estudio contempla el análisis de 96 cepas en total.

Reactivación en medio de cultivo líquido.

Las cepas bacterianas proporcionadas por la colección UTPL fueron reactivadas después de un periodo de tiempo en congelación de 8 semanas, para lo cual, se procedió a inocular 300 μ L de cada cultivo bacteriano en un tubo con 10 ml del medio líquido, BBL™ Trypticase™ Soy Broth (TSB), los tubos fueron sellados independientemente con parafilm y cubiertos con papel aluminio para incubarse a 27°C en agitación continua (75 rpm - 24 horas). Esto con el objetivo de incrementar la biomasa bacteriana para la extracción de ADN.

Caracterización molecular de bacterianas.

Se procedió a realizar la extracción de ADN de las 96 cepas bacterianas reactivadas en el medio de cultivo líquido por 24 horas, para ello se empleó el kit de extracción UltraClean Microbial DNA Isolation kit (MoBio) siguiendo el protocolo del fabricante.

Para la identificación de las cepas bacterianas, la región parcial V3 del ARNr 16S fue amplificada mediante PCR aplicando los primers Eub338 5' -ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG- 3' (forward) y Eub518 5' -ATT ACC GCG GCT GCT GG- 3' (reverse)¹¹ y con la ayuda de un termociclador (Applied Biosystem). Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial de 9 min a 94°C seguido de 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos de alineamiento a 55°C, y una extensión de 45 segundos a 72°C, y una etapa de polimerización final de 72°C durante 7 min. Cada reacción (25 μ L) contenía: 5 U de GoTag DNA polimerasa (PROMEGA), 5 μ L de buffer de reacción 5X, MgCl₂ 1 mM, 1 μ L de ADN molde, 0,2 mM de dNTPs (PROMEGA) y 0,25 μ L de cada primer.

Los amplicones de la PCR fueron separados mediante una corrida electroforética a 128 voltios y 300 mA durante 25 minutos en gel de agarosa al 1%, preparado con buffer SB1X y SYBR®Safe para la visualización del ADN en el gel. Las muestras se prepararon tomando 2 μ L del producto de la PCR mezclado con 1 μ L de buffer (5X Green GoTaq®Flexi Buffer) y se cargaron en cada pocillo del gel junto con 2 μ L del marcador

de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen) en el último pocillo.

Una vez terminada la comprobación de todos los productos de la PCR mediante electroforesis, se procedió a realizar la purificación de ADN, para lo cual, se utilizó el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, siguiendo el protocolo del fabricante.

Los productos de PCR purificados, fueron colocados en una placa de 96 pocillos con un volumen de 15 μ L por muestra, se sellaron y se enviaron a la compañía MacroGen, Korea (<http://www.macrogen.com/kor/>) para la obtención de las secuencias.

Análisis Bioinformático y filogenético.

El análisis fue realizado a partir de las 96 secuencias obtenidas, correspondientes a *Erato control*²⁴, *Miconia control*²⁴, *Erato contaminado*²⁴, *Miconia contaminado*²⁴.

Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit (Versión 7.2.5) y luego comparadas con secuencias en la base de datos del GenBank utilizando la opción Blast del sitio web NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para encontrar secuencias estrechamente relacionadas e identificar las cepas bacterianas.

Sobre la base de máxima identidad, fueron seleccionadas las primeras diez secuencias y utilizando la herramienta MAFFT (Versión 7, estrategia G-INS-i), fueron alineadas junto con las secuencias obtenidas de los aislados bacterianos.

El análisis filogenético, se realizó utilizando el software MEGA7. El árbol filogenético fue inferido usando el método de Máxima Verosimilitud. Las divergencias de las secuencias se cuantificaron utilizando el modelo de distancia "Kimura-2-Parameter". Para el tratamiento de los gaps, se eligió la opción "Use all sites". Se calcularon un total de 1000 repeticiones de bootstrap.

Resultados y discusión

Viabilidad de cepas.

Se determinó una viabilidad del 100 % de las cepas usadas luego de ser reactivadas en medios específicos, previo a la extracción de ADN.

Verificación de los amplicones a través de electroforesis.

Un total de 96 muestras fueron analizadas mediante electroforesis y se confirmó que todos los fragmentos de ADN amplificados tienen los tamaños esperados de aproximadamente 200 pares de bases en relación al marcador de peso molecular. La figura 1 muestra los resultados de los productos amplificados por PCR de un grupo de muestras con los primers Eub338 y Eub518.

Para el desarrollo del presente estudio, se realizó la amplificación de una región parcial del ARNr 16S correspondiente a la región hipervariable V3 del gen, cuyo tamaño aproximado es de 200 pb. Dicha región ha demostrado ser la más destacada para estudios de diversidad bacteriana debido a su mayor variabilidad y secuencia hipervariable más larga¹².

Análisis de secuencias y comparación en base de datos.

Luego de realizar el análisis de cada cromatograma, se determinó que 61 secuencias presentan cromatogramas de buena calidad para el análisis bioinformático. Las 35 secuencias faltantes no se utilizaron para la identificación molecular, ya que estas secuencias presentaban cromatogramas fallidos o

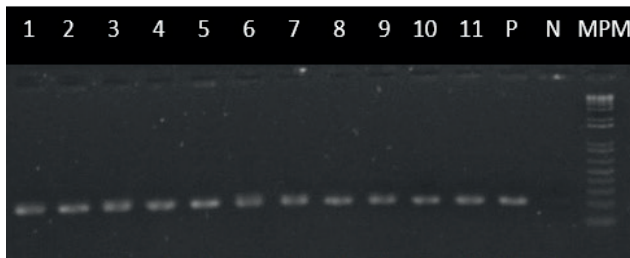


Figura 1. Amplificación por PCR de un fragmento corto de la región 16S en bacterias: 1-2: Muestras de *Miconia zamorensis* contaminado (MP); 3-5: Muestras de *Miconia zamorensis* control (MC); 6-8: Muestras de *Erato polymnoides* contaminado (EP); 9-11: Muestras de *Erato polymnoides* control (EC); P control positivo; N control negativo; MPM marcador de peso molecular.

irregulares.

Las 61 secuencias de las cepas bacterianas fueron analizadas a través de BLAST, mostrando una similitud del 99 - 100% con las secuencias homologas cercanas a la base de datos del GenBank. La identificación filogenética de los aislados bacterianos, basada en la secuenciación de la región parcial V3 del gen 16S ARNr se muestra en la Tabla 1.

Análisis filogenético de Bacterias.

El análisis filogenético basado en la secuenciación del gen ARNr 16S, reveló la similitud de los aislados bacterianos a los géneros *Bacillus* y *Lysinibacillus* pertenecientes al filo *Firmicutes* y *Proteobacteria* (género *Serratia*). El árbol construido por el método de Máxima Verosimilitud confirmó la posición filogenética de las cepas bacterianas (Figura 2).

En el presente estudio, se ha podido conocer la presencia de los géneros bacterianos *Bacillus*, *lysinibacillus* y *Serratia*, de más frecuente a menos frecuente respectivamente, tanto en la zona contaminada como en la zona control no contaminada (Figura 3 y Figura 4). Estos resultados son comparables con estudios realizados por donde mencionan que la abundancia del *phylum Firmicutes* (géneros *Bacillus* y *Lysinibacillus*)^{13,14}, se debe a que en el suelo existen condiciones que pueden favorecer el crecimiento de estos microorganismos, tales como, una mayor disponibilidad de nutrientes (carbono orgánico y porcentaje de nitrógeno y fósforo), altos niveles de humedad y salinidad extrema. Además, especies del género *Bacillus*, son cosmopolitas y se caracterizan por la formación de endosporas que les permite sobrevivir a diversas condiciones inhóspitas por largos periodos de tiempo, razón por la cual pueden ser hallados en la mayor parte de las muestras de suelo y agua en todo el planeta, además de poder prevalecer en el aire y en diversos huéspedes como las plantas¹⁵, en las que también es común encontrar una abundancia de este género en especies vegetales de la división *Magnoliopsida*^{16,17}.

La exposición a concentraciones elevadas de metales pesados, puede ser un factor adicional que puede llevar a la selección de estos microorganismos y favorecer a los más tolerantes o resistentes en los suelos de la rizósfera, debido a la rápida adaptación de estos microorganismos a los cambios ambientales^{18,19}. Varios estudios han reportado que muchas de las especies bacterianas aisladas en este estudio, pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Serratia*, están relacionadas con cepas degradantes y resistentes a diferentes metales pesados, entre los cuales se mencionan, Pb, Cu, Ni, Cr, Zn, Cd, Co y As, por lo que tienen un enorme potencial en la biorremediación de la acumulación de metales pesados en el suelo y agua^{20-22,17,23-26}. Bajo estas condiciones, se ha propuesto que la dominancia de algunos grupos bacterianos

se debe a interacciones competitivas en las que algunas especies bacterianas son eliminadas por exclusión competitiva y las especies mejor adaptadas son las que dominan¹³.

Como se muestra en las figuras 3 y 4 (ver en la versión online - <http://revistabionatura.com/2018.03.02.6.html>), no se evidencia una mayor diferencia en la distribución de los microorganismos identificados entre ambas áreas de estudio de donde se obtuvieron las cepas bacterianas. Esto puede deberse a que, según menciona¹⁰, tanto el área contaminada como el área control, se encuentran en una zona con alto grado de contaminación ambiental. En el área de muestreo contaminada por metales pesados, se registra una intensa actividad minera relacionada a la extracción de oro a pequeña escala; mientras que el área utilizada como control, pertenece a una zona minera abandonada, en la que las actividades mineras se detuvieron cinco años atrás del presente estudio, es decir que existieron condiciones similares de contaminación ya que según³, los compuestos inorgánicos, como es el caso de los metales pesados, pueden permanecer por largo tiempo en el suelo debido a que son difícilmente degradables.

Por otra parte, basándonos en la revisión bibliográfica, es interesante mencionar que los géneros *Bacillus* y *Serratia* están relacionadas con especies o grupos de bacterias PGPR (por sus siglas en inglés, plant growth promoting rhizobacteria) que tienen la capacidad de producir ciertas sustancias o metabolitos que promueven el crecimiento de las plantas, tales como, el ácido indol acético (IAA), sideróforos y la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), que mejoran el crecimiento, disminuyen el impacto negativo de las concentraciones de metales pesados tóxicos y por lo tanto, aumentan la eficacia de la fitorremediación^{16,17,19,22,25,27,28}.

En la actualidad, hay una gran atención enfocada en el tratamiento microbiano de los sitios contaminados por metales pesados y existe la necesidad de un mayor conocimiento de cepas bacterianas resistentes a estos metales⁷, ya que, las rizobacterias se utilizan en todo el mundo como bioinoculantes para promover el crecimiento y el desarrollo de las plantas bajo diverso estrés como los metales pesados²².

Conclusiones

El presente estudio permitió identificar una amplia variedad de comunidades bacterianas en el suelo de la rizósfera de las especies vegetales *Miconia zamorensis* y *Erato polymnoides*. Esta contribución puede motivar a los investigadores a unir esfuerzos para usar microorganismos como potenciales elementos en proyectos de biorremediación para descontaminar suelos con metales pesados.

Este reporte sobre la identificación de especies bacterianas ha contribuido con información relevante de las especies dominantes en suelos contaminados, dando el inicio para en una siguiente fase realizar ensayos in vitro con el objetivo de determinar la capacidad PGPR y de resistencia a metales pesados de estos componentes bacterianas y posteriormente su aplicación en proyectos biotecnológicos para biorremediar suelos contaminados.

Agradecimientos

Quiero agradecer de manera muy especial al Bq. Oscar Amable Vivanco Galván por su ayuda y apoyo incondicional durante todo el trascurso de mi trabajo, por su asesoramiento y valiosos consejos en todo el proceso de esta investigación y también al PhD. Aminael Sánchez Rodríguez por la predisposición, sugerencias y apoyo para este trabajo.

Tabla 1. Comparación de secuencias de aislados bacterianos con BLAST.

Código	Fuente de aislamiento		Identificación filogenética basada en la base de datos del GenBank ⁺
	Especie vegetal	Zona de muestreo	
EC1	<i>Erato Polymnoides</i>	Control	<i>Serratia sp.</i>
EC2	<i>Erato Polymnoides</i>	Control	<i>Lysinibacillus sp.</i>
EC3	<i>Erato Polymnoides</i>	Control	<i>Bacillus sp.</i>
EC4	<i>Erato Polymnoides</i>	Control	<i>Lysinibacillus sp.</i>
EC5	<i>Erato Polymnoides</i>	Control	<i>Lysinibacillus sp.</i>
EC6	<i>Erato Polymnoides</i>	Control	<i>Uncultured Bacillus sp.</i>
EC7	<i>Erato Polymnoides</i>	Control	<i>Bacillus cereus</i>
EC8	<i>Erato Polymnoides</i>	Control	<i>Bacillus cereus</i>
EC9	<i>Erato Polymnoides</i>	Control	<i>Bacillus sp.</i>
EC10	<i>Erato Polymnoides</i>	Control	<i>Bacillus cereus</i>
EC11	<i>Erato Polymnoides</i>	Control	<i>Bacillus cereus</i>
EC12	<i>Erato Polymnoides</i>	Control	<i>Bacillus sp.</i>
EC13	<i>Erato Polymnoides</i>	Control	<i>Bacillus cereus</i>
EC14	<i>Erato Polymnoides</i>	Control	<i>Bacillus cereus</i>
EC15	<i>Erato Polymnoides</i>	Control	<i>Bacillus anthracis</i>
EP1	<i>Erato Polymnoides</i>	Contaminada	<i>Serratia sp.</i>
EP2	<i>Erato Polymnoides</i>	Contaminada	<i>Lysinibacillus sp.</i>
EP3	<i>Erato Polymnoides</i>	Contaminada	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
EP4	<i>Erato Polymnoides</i>	Contaminada	<i>Bacillus cereus</i>
EP5	<i>Erato Polymnoides</i>	Contaminada	<i>Bacillus cereus</i>
EP6	<i>Erato Polymnoides</i>	Contaminada	<i>Bacillus cereus</i>
EP7	<i>Erato Polymnoides</i>	Contaminada	<i>Bacillus cereus</i>
EP8	<i>Erato Polymnoides</i>	Contaminada	<i>Bacillus sp.</i>
EP9	<i>Erato Polymnoides</i>	Contaminada	<i>Streptomyces sp.</i>
EP10	<i>Erato Polymnoides</i>	Contaminada	<i>Bacillus thuringiensis</i>
EP11	<i>Erato Polymnoides</i>	Contaminada	<i>Bacillus cereus</i>
EP12	<i>Erato Polymnoides</i>	Contaminada	<i>Bacillus cereus</i>
EP13	<i>Erato Polymnoides</i>	Contaminada	<i>Bacillus cereus</i>
EP14	<i>Erato Polymnoides</i>	Contaminada	<i>Bacillus cereus</i>
EP15	<i>Erato Polymnoides</i>	Contaminada	<i>Bacillus thuringiensis</i>
EP16	<i>Erato Polymnoides</i>	Contaminada	<i>Bacillus cereus</i>
EP17	<i>Erato Polymnoides</i>	Contaminada	<i>Bacillus thuringiensis</i>
EP18	<i>Erato Polymnoides</i>	Contaminada	<i>Bacillus thuringiensis</i>
MC1	<i>Miconia zamorensis</i>	Control	<i>Serratia marcescens</i>
MC2	<i>Miconia zamorensis</i>	Control	<i>Lysinibacillus sp.</i>
MC3	<i>Miconia zamorensis</i>	Control	<i>Lysinibacillus sp.</i>
MC4	<i>Miconia zamorensis</i>	Control	<i>Bacillus thuringiensis</i>
MC5	<i>Miconia zamorensis</i>	Control	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
MC6	<i>Miconia zamorensis</i>	Control	<i>Bacillus thuringiensis</i>
MC7	<i>Miconia zamorensis</i>	Control	<i>Bacillus cereus</i>
MC8	<i>Miconia zamorensis</i>	Control	<i>Bacillus cereus</i>
MC9	<i>Miconia zamorensis</i>	Control	<i>Bacillus thuringiensis</i>
MC10	<i>Miconia zamorensis</i>	Control	<i>Bacillus sp.</i>
MC11	<i>Miconia zamorensis</i>	Control	<i>Bacillus thuringiensis</i>
MC12	<i>Miconia zamorensis</i>	Control	<i>Bacillus cereus</i>

Figura 2. Relaciones filogenéticas basadas en la secuenciación del gen ARNr 16S entre las cepas aisladas y las secuencias de varias especies de referencia recuperadas de la base de datos GenBank del NCBI. El árbol fue generado mediante el método de Máxima Verosimilitud con 1000 réplicas de bootstrap. Solo se muestran los valores de bootstrap $\geq 70\%$. Los números de acceso al GenBank para las secuencias de referencia se dan después del nombre de la cepa. La especie *Alicyclobacillus aeris* se utilizó como grupo externo.



0.05

Referencias bibliográficas

1. Conant J, Fadem P. Guía comunitaria para la Salud Ambiental. Berkeley: Hesperian; 2011. 635 p.
2. Buckley DH, Schmidt TM. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environ Microbiol*. 2003;5(6):441–452.
3. Durán P. Transferencia de metales de suelo a planta en áreas mineras: Ejemplos de los Andes peruanos y de la Cordillera Pre-litoral Catalana [Internet]. Universidad de Barcelona; 2010. Available from: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/36122>
4. Ali H, Khan E, Sajad MA. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;91(7):869–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
5. Guo Z, Megharaj M, Beer M, Ming H, Rahman MM, Wu W, et al. Heavy metal impact on bacterial biomass based on DNA analyses and uptake by wild plants in the abandoned copper mine soils. *Bioresour Technol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;100(17):3831–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.043>
6. Gonzalez-Chavez M del CÁ. Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoam*. 2005;23(1):29–37.
7. Vigliotta G, Matrella S, Cicatelli A, Guarino F, Castiglione S. Effects of heavy metals and chelants on phytoremediation capacity and on rhizobacterial communities of maize. *J Environ Manage* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;179:93–102. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301479716302262>
8. Das S, Dash HR. Microbial bioremediation: A potential tool for restoration of contaminated areas [Internet]. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Rourkela, Odisha: Elsevier Inc.; 2014. 1–20 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800002-1.2.00001-7>
9. Karigar CS, Rao SS. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants : A review. *Enzyme Res*. 2011;1–11.
10. Ochoa JF, Sánchez-Rodríguez A. Caracterización molecular y criopreservación de hongos y bacterias asociados a la rizósfera de especies vegetales acumuladoras de metales pesados en suelos contaminados por minería. *Bionatura* [Internet]. 2017;2(2):288–95. Available from: <http://revistabionatura.com/2017.02.02.3.html>
11. Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R, Jackson RB. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2005;71(7):4117–20. Available from: <http://aem.asm.org/content/71/7/4117.short>
12. Vasileiadis S, Puglisi E, Arena M, Cappa F, Coconcelli PS, Trevisan M. Soil bacterial diversity screening using single 16S rRNA gene V regions coupled with multi-million read generating sequencing technologies. *PLoS One*. 2012;7(8):1–11.
13. Aislabie JM, Jordan J, Barker GM. Relation between soil classification and bacterial diversity in soils of the Ross Sea region, Antarctica. *Geoderma*. 2008;144(1–2):9–20.
14. Aislabie J, Jordan S, Ayton J, Klassen JL, Barker GM, Turner S. Bacterial diversity associated with ornithogenic soil of the Ross Sea region, Antarctica. *Can J Microbiol*. 2009;55:21–36.
15. Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2000;64(3):548–72. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=99004&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
16. Khan M, Sessitsch A, Harris M, Fatima K, Imran A, Arslan M, et al. Cr-resistant rhizo- and endophytic bacteria associated with *Prosopis juliflora* and their potential as phytoremediation enhancing agents in metal-degraded soils. *Front Plant Sci*. 2015;5(January):1–10.
17. Luo S, Chen L, Chen J, Xiao X, Xu T, Wan Y, et al. Analysis and characterization of cultivable heavy metal-resistant bacterial endophytes isolated from Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their potential use for phytoremediation. *Chemosphere* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;85(7):1130–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.053>
18. Chen M, Xu P, Zeng G, Yang C, Huang D, Zhang J. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnol Adv* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;33(6):745–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.003>
19. Zhang W, Huang Z, He L, Sheng X. Assessment of bacterial communities and characterization of lead-resistant bacteria in the rhizosphere soils of metal-tolerant *Chenopodium ambrosioides* grown on lead – zinc mine tailings. *Chemosphere* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;87(10):1171–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.036>
20. Tomova I, Stoilova-Disheva M, Vasileva-Tonkova E. Characterization of heavy metals resistant heterotrophic bacteria from soils in the Windmill Islands region, Wilkes Land, East Antarctica. *Polish Polar Res*. 2014;35(4):593–607.
21. Gupta K, Chatterjee C, Gupta B. Isolation and characterization of heavy metal tolerant Gram-positive bacteria with bioremediation properties from municipal waste rich soil of Kestopur canal (Kolkata), West Bengal, India. *Versita*. 2012;67(5):827–36.
22. Kumar V, Singh S, Singh J, Upadhyay N. Potential of plant growth promoting traits by bacteria isolated from heavy metal contaminated soils. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2015;
23. Pepi M, Volterrani M, Renzi M, Marvasi M, Gasperini S, Franchi E, et al. Arsenic-resistant bacteria isolated from contaminated sediments of the Orbetello Lagoon, Italy, and their characterization. *J Appl Microbiol*. 2007;103:2299–308.
24. Peña-Montenegro TD, Dussán J. Genome sequence and description of the heavy metal tolerant bacterium *Lysinibacillus sphaericus* strain OT4b.31. *Stand Genomic Sci*. 2013;9:42–56.
25. Khan AR, Park G, Asaf S, Hong S, Jung K, Shin J. Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. *PLoS One*. 2017;1–17.
26. Jafarzade M, Mohamad S, Usup G, Ahmad A. Heavy metal tolerance and antibiotic susceptibility of red pigmented bacteria isolated from marine environment. *Nat Resour*. 2012;3:171–4.
27. Dharni S, Kumar A, Samad A, Dhar D. Impact of plant growth promoting *Pseudomonas monteilii* PsF84 and *Pseudomonas plecoglossicida* PsF610 on metal uptake and production of secondary metabolite (monoterpenes) by rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens* cv. bourbon) grown on tannery sludge. *Chemosphere* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;117:433–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.001>
28. Kumar K V, Singh N, Behl HM, Srivastava S. Influence of plant growth promoting bacteria and its mutant on heavy metal toxicity in *Brassica juncea* grown in fly ash amended soil. *Chemosphere*. 2008;72:678–83.

Recibido: 21 noviembre 2017

Aprobado: 15 enero 2018

RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

Aplicación de la electroterapia para la eliminación del virus del mosaico del pepino (CMV) en plantas micropropagadas de banano (*Musa spp.*)

Application of electrotherapy for the elimination of cucumber mosaic virus (CMV) in micro-propagated banana plants (*Musa spp.*)

José García Onofre, Alberto Montes Carballal, Efrén Santos Ordoñez, José Flores Cedeño

DOI. 10.21931/RB/2018.03.02.7

602

Resumen: Actualmente las enfermedades y la falta de material certificado para la siembra están originando una serie de inconvenientes al cultivo de banano, siendo amenazas constantes los diferentes agentes bióticos (bacterias, hongos o virus). En el cultivo de banano, el virus del mosaico de pepino CMV (*cucumber mosaic virus*) tiene una distribución mundial con características en su sintomatología que lo hacen muchas veces pasar inadvertido por el agricultor, teniendo como consecuencia pérdidas que podrían llegar entre 40 al 60%. El presente trabajo tuvo como objetivo el empleo de la electroterapia para el saneamiento de plantas infectadas por CMV en banano, cv. 'Williams'. Los colinos infectados fueron micropropagados y las plantas regeneradas fueron verificadas para la presencia del virus por la técnica de RT-PCR y ELISA. Posteriormente fueron aclimatadas y sometidas a la altura correspondiente fueron procesadas y sometidas a la corriente eléctrica. Los tratamientos evaluados consistieron en la exposición de los explantes a variables de voltaje por tiempo, en series de 10V/25 min, 15V/20 min, 20V/15 min y 20V/20 min. Los resultados para la erradicación del virus CMV (*cucumber mosaic virus*) fueron de 8% (explantes saneados) del total de explantes, después de la electroterapia. Aunque el método solo eliminó el 8% de las plantas infectadas, sin embargo, se observó un notable incremento en la altura de los explantes (3 a 4 cm) con respecto al control (sin electroterapia) pudiendo significar de gran utilidad para empresas que se dedican a la multiplicación masiva de plantas ya que las vigoriza e incrementan su vitalidad para los procesos *in vitro*. El estudio realizado sería el primer reporte del uso de la electroterapia para el saneamiento de plantas de banano en el Ecuador. Aunque se conoce su uso en otros países con excelentes resultados en cultivos de interés agrícola como: caña de azúcar, malanga, y plátano.

Palabras clave: Virus del mosaico del pepino, electroterapia, colinos.

Abstract: Currently, the diseases and the lack of certified material for the company are causing a series of inconveniences to the banana crop, being constant the different biotic agents (bacteria, fungi or virus). In the cultivation of banana, the cucumber mosaic virus CMV (*cucumber mosaic virus*) has a worldwide distribution with characteristics in its symptoms that often goes unnoticed by the farmer, resulting in losses that are received between 40 60%. The objective of this work was the use of electrotherapy for the sanitation of plants infected with CMV in banana, cv. 'Williams'. The infected banana trees were micropropagated and the regenerated plants were verified by the presence of the virus by the technique of RT-PCR and ELISA. Later they were acclimated in umbráculos and fulfilling the height that were processed and happened to the electrical current. The treatments evaluated consisted of exposing the explants to the voltage variables by time, in series of 10 V / 25 min, 15 V / 20 min, 20 V / 15 min and 20 V / 20 min. The results for the eradication of the CMV virus (*cucumber mosaic virus*) were 8% (sanitized explants) of the total explants, after the electrotherapy. Although the method only eliminated 8% of the infected plants, however, there was a notable increase in the height of the explants (3 to 4 cm) with respect to the control (without electrotherapy), which could be very useful for companies that devote to the massive multiplication of plants that are already in force and increase their vitality for *in vitro* processes. The study made the first report of the use of electrotherapy for the sanitation of banana plants in Ecuador. Although it is known as use in other countries with good results in crops of agricultural interest such as: sugar cane, taro, and banana.

Key words: Cucumber mosaic virus, electrotherapy, banana trees.

Introducción

Dentro de las musáceas, el banano es un cultivo de importancia económica y social, pues en el ámbito comercial, agronómico y nutricional representan una parte significativa en el desarrollo de las distintas comunidades de América Latina¹. Particularmente para Ecuador, el cultivo tiene una mayor relevancia, ya que en promedio representa un 26% del PIB agrícola del país y aporta en un 2% al PIB total, constituyéndose en un producto tradicional dentro de las exportaciones. Estos porcentajes evidencian la importancia de la industria del banano en la economía del Ecuador². Las enfermedades virales son uno de

los factores responsables de las pérdidas en producción de banano en el mundo, ya que limitan la multiplicación e intercambio de germoplasma³, lo que conlleva finalmente al deterioro de la calidad del cultivo en las zonas productoras^{3,4 y 5}.

Para el caso del mosaico del banano ocasionado por CMV (*cucumber mosaic virus*), este patógeno afecta el cultivo ocasionando la reducción del número de manos, deformación de frutos y en casos severos hasta la muerte de la planta⁶. En la actualidad existen escasos reportes sobre la eliminación de este virus, por ejemplo, el tratamiento térmico combinado

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

con micropropagación, logró una alta efectividad para la eliminación de CMV⁷. Buenos resultados también se obtuvieron al aplicar corriente eléctrica a estacas de almendra que presentaban la sintomatología del virus del mosaico, obteniendo hasta un 90% de plantas sanas⁸. Las técnicas de saneamiento vegetal generalmente, consideran el patógeno y su transmisión en el tejido de las plantas para atenuar o eliminar virus y bacterias en el material vegetal. Algunas de estas técnicas son el cultivo de meristemos, termoterapia, quimioterapia, crioterapia y electroterapia^{9, 10, 12}. En su mayoría logran resultados eficientes (100% material saneado) pero así mismo estas técnicas no logran adecuarse al proceso productivo. Algunos de los aspectos que contribuyen a la baja eficiencia son: la gran cantidad de material inicial destruido y los largos períodos de tiempo requeridos para obtener resultados¹¹. Actualmente en Ecuador, el movimiento por todo el país de materiales de propagación de banano no certificado está ocasionando la diseminación de estas enfermedades virales y demás problemas fitosanitarios. Esto exige cambios estratégicos con lo que se pueda suplir la gran demanda de material sano para la micropropagación. Estos aspectos han contribuido a la aplicación de técnicas de saneamiento para la desinfección de semillas, una de estas es la electroterapia. Por ejemplo, aplicando electricidad en ajo, caña de azúcar, patatas y *araceae*, se ha logrado eliminar potyvirus, luteovirus y carlavirus, respectivamente¹¹. Además, la eficiencia de la electroterapia ha sido previamente investigada en plantas infectadas con BSV (*Banana Streak Virus*) obteniendo 40-80% de plantas saneadas¹³. También el tratamiento térmico (termoterapia) combinado con el cultivo de meristemos ha tenido éxito en la erradicación del CMV⁷.

El objetivo de este trabajo fue aplicar la electroterapia en ápices meristemáticos de plantas de banano, como alternativa en la desinfección del virus (CMV).

Materiales y métodos

Para obtener la fuente viral inicial de Banana Mosaic Virus (CMV), se procedió a identificar en campo plantas con la sintomatología correspondiente y detectar la presencia viral mediante RT-PCR y ELISA¹⁴. Las plantas infectadas, fueron

llevadas al invernadero y mantenidas en una zona aislada libre de afidos. Del material infectado, se extrajeron explantes (meristemos apicales) donantes para el establecimiento de la micropropagación de acuerdo a los protocolos estandarizados del CIBE en banano. Los brotes *in vitro* se colocaron en medio Murashige y Skoog (MS) que estuvo compuesto por las sales minerales¹⁵ para la fase de proliferación, que se suplementó con vitaminas, sacarosa y con reguladores como citocininas KIN (1.25 mg/l), auxinas AIA (0.52 mg/l) y 6 – BAP (4 mg/l), y solidificado con phytigel (2g/l). El material fue subcultivado cada treinta días, obteniendo el volumen suficiente de propágulos para su posterior enraizamiento y transferencia al área de invernaderos (Fig. 1a).

Resultados y discusión

Detección de virus

Las plantas propagadas fueron monitoreadas continuamente para observar la presencia de síntomas. Se tomaron muestras de hojas para el respectivo diagnóstico de CMV mediante RT-PCR y ELISA¹⁴, estos diagnósticos se realizaron inicialmente en la fase *in vitro* y posteriormente en la fase de aclimatación (invernadero). Una vez que las plantas fueron verificadas que estaban infectadas con el virus, estas se entregaron al laboratorio de cultivos de tejidos para los ensayos de desinfección propuestos (electroterapia) (Fig. 1).

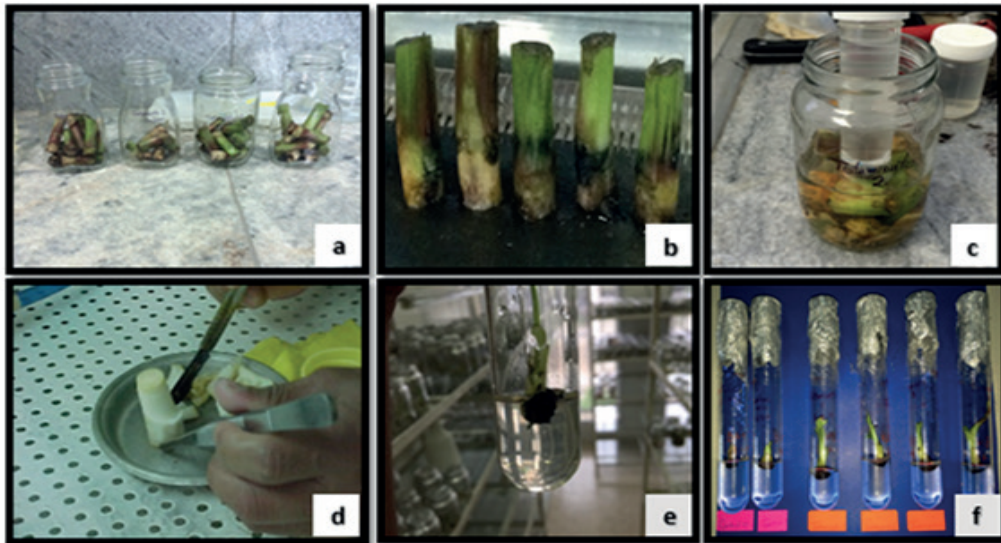
Evaluación del límite de corriente.

Para determinar el límite de sobrevivencia del tejido, los explantes fueron sometidos a distintos voltajes en diferentes rangos de tiempo. Como paso inicial los cormos obtenidos del campo fueron limpiados, y cortados para luego ser lavados con detergente e hipoclorito de sodio al 3%, a continuación, se diseccionaron a un tamaño homogéneo de 1,5 cm de base por 2,5 cm de alto y posteriormente fueron colocados en el equipo de electroterapia donde se evaluaron los siguientes voltajes: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 V durante rangos de tiempo de 5, 10, 15, 20 y 25 minutos. En cada combinación (tratamiento) se utilizaron cinco explantes (fig. 1e), los cuales luego del tratamiento de



Figura 1. a) Plantas de banano infectadas (material biológico), b) Selección de plantas de banano para entrega al laboratorio, c) Limpieza de plantas seleccionadas, d) Preparación de muestras (desinfección y disección), e) Muestras dispuestas en el equipo para aplicación de electroterapia, f) Explantes introducidos *in vitro* después de la electroterapia.

Figura 2. Electroterapia: a) Distribución de explantes para ser sometidos a tratamientos óptimos resultado de las pruebas de sensibilidad, b) Aplicación de corriente eléctrica, c) Desinfección en hipoclorito de sodio previo a la introducción al flujo laminar, d) Disección de las muestras previo a la introducción *in vitro*, e) Siembra en tubos de ensayo, f) Evaluación del comportamiento *in vitro* de las muestras electrocutadas.



electroterapia fueron introducidos *in vitro*. Los explantes electrocutados fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 2% y posteriormente sembrados en tubos de ensayo con medio de establecimiento Murashige y Skoog (MS) (fig. 1f).

Diagnóstico de virus.

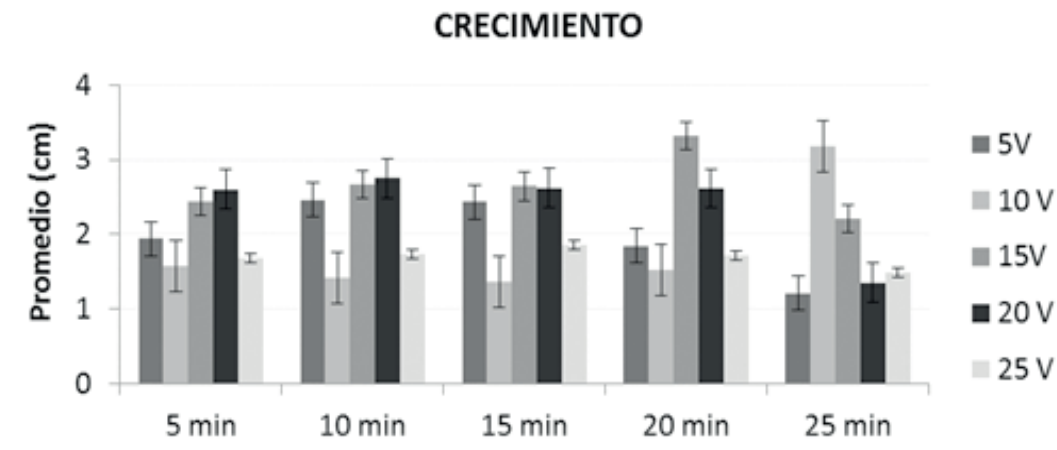
La efectividad de la desinfección en cada tratamiento se evaluó mediante RT – PCR y ELISA¹⁴. En la detección por RT – PCR fueron usados iniciadores para la amplificación del gen CP (260bp) del CMV (cucumber mosaic virus), para el ensayo de ELISA se utilizaron kits comerciales siguiendo las recomendaciones del fabricante AC-Diagnostics (www.acdiainc.com/cmvt.htm). Se consideró dos veces el valor promedio de los negativos (muestra sin virus) como línea de corte. La tasa de erradicación (TE) observada para cada tratamiento se calculó de la siguiente manera:

$$TE = \left(\frac{\# \text{MUESTRA NEGATIVA}}{\# \text{MUESTRA TOTAL DIAGNOSTICADA}} \right) \times 100$$

Evaluación del límite de corriente.

Los tratamientos con 25v resultaron desfavorables para las vitro plantas de banana. Esto se estableció después de la evaluación de la sensibilidad del tejido de banana valorando su sobrevivencia y crecimiento. Los mejores tratamientos, en cuanto a los voltajes y tiempos de aplicación de corriente eléctrica, fueron de las series de 10V/25min, 15V/20 min, 20V/15 min y 20V/20 min. Ha sido reportado por Hernández¹¹ dosis máximas de 30v para los cultivos de ajo y caña de azúcar lo que no coincide con los resultados obtenidos en nuestra investigación, pero cabe señalar la falta de homogeneidad en las pruebas debido a los diversos tipos de explantes usados de las diferentes especies (caña, banana, malanga etc.), lo que conduce a diferencias de la potencia eléctrica que circula a través de cada uno de ellos (Fig. 2b). Referente al crecimiento *in vitro* de los explantes, se observó un incremento significativo (3-4 cm) de la altura de las plantas con respecto al control (Fig. 2f). Esto coincide con estudios que señalan que la corriente eléctrica estimula el crecimiento de las células¹⁷. Las figuras 3 y 4 muestran los promedios de crecimiento y sobrevivencia para cada tratamiento.

Figura 3. Promedios de crecimiento para cada tratamiento (tiempo/voltaje)



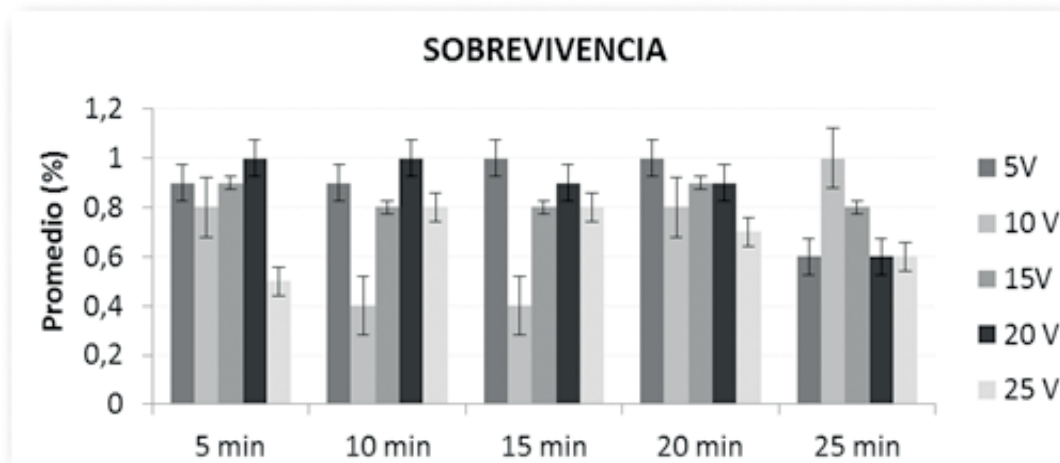


Figura 4. Promedios de sobrevivencia para cada tratamiento (tiempo/voltaje).

Diagnóstico de virus.

Se hizo la evaluación de 100 muestras de hoja de diferentes plantas de banano en etapa de invernadero provenientes de colinos infectadas que fueron micropropagados, el porcentaje de plántulas sanas *in vivo* fue 0% (0 plántulas de 100 probadas). Cada muestra fue analizada por triplicado determinándose que todas las muestras resultaron positivas para el Virus del mosaico del pepino (CMV). La eficacia de la electroterapia fue reportada por Hernández¹¹ para la eliminación del potyvirus, luteovirus y carlavirus en ajo, caña de azúcar, patatas respectivamente además de una eliminación de BSV (banana Streak Virus) en 40 – 80 % de plantas regeneradas¹³. En base de estas experiencias fueron evaluadas mediante RT-PCR y ELISA, cincuenta muestras correspondientes a cuatro tratamientos de electroterapia junto con un control (10V / 25 min, 15V / 20 min, 20V / 15 min, 20V / 20 min, 0V / 0 min), el porcentaje preliminar de plantas sanas regeneradas a partir de los explantes sometidos a electroterapia alcanzaron un 8% equivalente a 3 plantas de 40 evaluadas (Fig. 5). Lo que se ajusta a los resultados obtenidos por Helliot¹⁸ quien reporto 11

% de saneamiento para muestras de banano con CMV, atribuyéndose posiblemente estos resultados a la distribución de las partículas virales dentro del meristemo¹⁷.

Tabla 1. Resultados por tratamiento del diagnóstico in vitro de plantas de banano variedad Williams tratadas con electroterapia.

Tratamientos	Material diagnosticado (%)	Desinfección (%)
10 V / 25 min	10 (100)	1(10)
15 V / 20 min	10(100)	1(10)
20 V / 15 min	10(100)	1(10)
20 V / 20 min	10(100)	0(0)

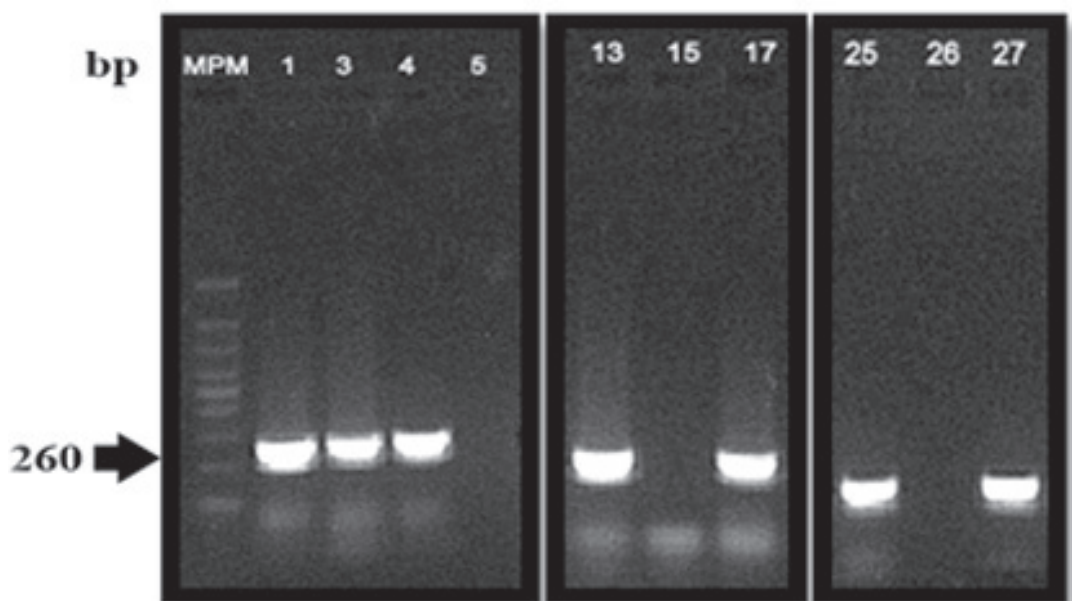


Figura 5. Gel de electroforesis de detección RT-PCR para el virus del mosaico del pepino en banano (CMV). Con la flecha se indica el tamaño del producto amplificado. Muestras negativas (5,15,26)

Conclusiones

De los resultados obtenidos podemos concluir que la metodología de saneamiento utilizada (electroterapia), resulta insuficiente para la eliminación del virus en estudio. El porcentaje de plántulas saneadas fue del 8% después de la electroterapia, considerándose relevante ya que este material se puede micropropagar y así recuperar las cantidades deseadas del cultivar.

Otro aspecto a destacar es que el uso de la corriente eléctrica influyó sobre el vigor y crecimiento de los tejidos, ofreciendo una importante información para las empresas que se dedican a la propagación masiva de plantas, pudiéndose insertar un paso previo a sus procesos, que permita mejorar su sanidad y vigorización.

Referencias bibliográficas

1. Albarrán, J. G., Fuenmayor, F., Fuchs, M., Martínez, G., Rodríguez, A., Manzanilla, E., & Torrealba, M. (2011). Estrategias biotecnológicas para la conservación de germoplasma en el INIA-CENIAP Venezuela. Caso yuca y musáceas. *Agronomía Tropical*, 61(1), 85-94.
2. Arteaga Medina, S. I. (2013). Estudio de la cadena de valor agroalimentaria del banano de Ecuador (Master's thesis, ESPAÑA/Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos-Universidad Politécnica de Madrid/2013).
3. Lockhart, B.E L. 2002. Management of viral diseases of banana. Pp. 217-221. En: Memorias XV Reunión ACORBAT. Cartagena de Indias, Colombia. 27 de octubre al 2 de noviembre de 2002.
4. James, A.P. 2011. Viruses of banana in east Africa. Queensland University of technology. Centre for Tropical Crops and Biocommodities. Faculty of Science and Technology. Thesis Ph.D. Consulta: noviembre de 2014. <http://eprints.qut.edu.au/51288/1/>.
5. Alarcón, J.J., Betancourt, M., Castaño, J. & Aristizábal, M. 2005. Reconocimiento de enfermedades virales en plátano y banano en la granja Montelindo, municipio de Palestina (Caldas). Pp. 238-241.
6. López-Cardona, N., Villegas-Estrada, B., & Arango-Isaza, R. E. Evaluación de incidencia y pérdidas ocasionadas por virus que afectan cultivos de plátano y banano (musa spp.) En la zona central cafetera.
7. Berg, L. A., & Bustamante, M. (1974). Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free bananas. *Phytopathology*.
8. Quacquerelli, A; Galliteli, D; Sarrino, V; Piazzola, P. 1980. The use of electrical corrient (RACE) for obtaining Mosaic free Almonds. *Acta Phytopathologica. Academic Scientianrum Hungaricae* 15(14):155-251.
9. Lozoya, SH. 1981. Chemo and thermotherapy of plant viruses. *Dissertation Riverside, University of California*.
10. Hernández, R; Noa, J C; Pichardo T; Igarza, Y. 1995 Saneamiento al Complejo Viral del Ajo (*Allium sativum*. L), mediante termoterapia y cultivo meristemo. *Cuaderno de Fitopatología no. No 47*.
11. Hernández, R; Fontanella, J; Noa, J C; Pichardo, T; Manzo, R; Cárdenas, H. 1997a. Electroterapia, nuevo método para el saneamiento del virus en *Allium sativum* L. Con optimización del diagnóstico por UM - ELISA. *Centro Agrícola (Cuba)* 24(1):92-93.
12. Quack, F.1977. Meristem culture and virus free plants. In Quack, F. *Applied and fundamental aspect of plant cell, tissue and organ culture*. New York, Springer - Verlagp. 598 - 615.
13. Hernández, R., Bertrand, H., Lepoivre, P., González, J. E., Rojas, X., Pairol, A & Cortés, C. (2002). Diagnosis and elimination of banana streak virus (BSV) in *Musa* spp. *Centro Agrícola*, 29(2), 42-47.
14. Quito-Avila, D. F., Ibarra, M. A., Alvarez, R. A., Ratti, M. F., Espinoza, L., Cevallos-Cevallos, J. M., & Peralta, E. L. (2013). First report of banana bract mosaic virus in 'cavendish' banana in Ecuador. *Plant Disease*, 97(7), 1003-1003.
15. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
16. Wagele, R. (1978). Procedimiento para influir en el crecimiento de células e individuos bacterianos, animales y vegetales. *Patentans Piiche*, 28(41), 933.
17. Helliot, B., Panis, B., Busogoro, J. P., Sobry, S., Poumay, Y., Raes, M., ... & Lepoivre, P. (2007). Immunogold silver staining associated with epi-fluorescence for cucumber mosaic virus localisation on semithin sections of banana tissues. *European journal of histochemistry: EJH*, 51(2), 153.
18. Helliot, B., Panis, B., Hernandez, R., Swennen, R., Lepoivre, P., & Frison, E. (2004). Development of in vitro techniques for the elimination of Cucumber Mosaic Virus from banana (*Musa* spp.). In *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations. Proceedings of a meeting held in Leuven, Belgium, 24-28 September 2001*.

Recibido: 3 diciembre 2017

Aprobado: 10 febrero 2018

RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

Cepas autóctonas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol *in vitro* de *Alternaria* spp. en *Brassica oleracea* var. *italica*.

Native strains of *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent *in vitro* *Alternaria* spp. In *Brassica oleracea* var. *italica*.

Acurio, R.¹, Ñacato, C. Valencia, M.

DOI: 10.21931/RB/2018.03.02.8

Resumen: La enfermedad provocada por el hongo fitopatógeno *Alternaria* spp. es una de las principales causas de daños en cultivos de brócoli en Ecuador, llegando a ocasionar hasta el 30% en pérdidas. Este trabajo se realizó con el fin de determinar la capacidad antagonista de cepas autóctonas de *Bacillus subtilis* frente a *Alternaria* spp., mediante pruebas *in vitro*. En el estudio se utilizaron cepas de *B. subtilis* aisladas de las principales zonas productoras de brócoli en el Ecuador. Tanto las cepas patógenas como las antagonistas fueron aisladas e identificadas a partir de muestras en campo tomadas aleatoriamente de cultivos de brócoli en las provincias de Cotopaxi, Imbabura y Tungurahua. La capacidad antagonista se midió utilizando la escala de Bell. Los resultados obtenidos indican que la cepa ATCC 6633 y la cepa AB-4 identificadas y caracterizadas bioquímicamente como *Bacillus subtilis* subsp. *licheniformis*, presentaron una actividad antagonista con un valor promedio de 45.21 cm clase 2 según la escala de Bell, determinado así el potencial de *Bacillus subtilis* como controlador biológico contra *Alternaria* spp.

Palabras Claves: Biocontrol, brócoli, capacidad antagonista, Escala de Bell.

Abstract: The disease caused by the phytopathogenic fungus *Alternaria* spp., is one of the main causes of damages in broccoli crops in Ecuador, inducing losses of up to 30%. This research was carried out in order to determine the antagonistic capacity of native strains of *Bacillus subtilis* against *Alternaria* spp. by the means of *in vitro* techniques. In the study, we used strains of *Bacillus subtilis* isolated, belonging to the main broccoli producing areas in Ecuador. Both pathogenic strains and antagonists were isolated and identified from soil samples randomly taken from broccoli crops in the provinces of Cotopaxi, Imbabura and Tungurahua. The antagonistic capacity was measured using the Bell's Scale. The results obtained indicate that the strain ATCC 6633 and strain AB-4 identified and characterized biochemically as *Bacillus subtilis* subsp. *licheniformis*, exhibit antagonistic activity with an average value of 45.21 cm Class 2 according to the Bell's Scale. These observations establish that *Bacillus subtilis* has a potential to act as a biological control against *Alternaria* spp.

KeyWords: Biocontrol, broccoli, antagonistic capacity, Bell's Scale.

Introducción

Uno de los factores que afectan la producción del cultivo de brócoli en el Ecuador son las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos. *Alternaria* spp. es uno de los principales causantes de enfermedades que afectan al brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), este se caracteriza por producir un atizamiento y daño en la inflorescencia que se inicia como una decoloración café y puede involucrar un florete o varios a la vez, se puede apreciar en el envés de las hojas manchas de color oscuro a manera de una mancha de aceite; cuando esto ocurre es casi seguro que la pella, en cualquier estado de formación, presentará una o varias inflorescencias con pudriciones, por ello la presencia de la enfermedad en el cultivo de brócoli impide que estas puedan ser comercializadas. Se ha estimado que esta enfermedad puede ocasionar hasta un 30% de pérdidas de pellas^{1,2}.

B. subtilis provee un control efectivo de enfermedades causadas por hongos y bacterias. El potencial de esta bacteria se basa en su capacidad para producir una amplia gama de moléculas bioactivas, que muestran propiedades antifúngicas, junto con una baja toxicidad y alta biodegradabilidad, adicionalmente, la capacidad de formar endosporas, le proporcionan un alto nivel de resistencia a condiciones ambientales extremas³.

Este trabajo se realizó con el fin de determinar la capacidad antagonista de cepas autóctonas de *B. subtilis* aisladas y

purificadas de las principales zonas productoras de brócoli en el Ecuador frente a *Alternaria* spp. en pruebas *in vitro*; para obtener un potencial biocontrolador natural que no afecte a la calidad del brócoli generando una en el uso de pesticidas que puedan causar daño al consumidor.

Materiales y métodos

Recolección de muestras

Las diferentes cepas de *B. subtilis* fueron aisladas de muestras de suelo provenientes de fincas productoras de brócoli ubicadas en las provincias de Cotopaxi, Imbabura y Tungurahua. Las muestras de *Alternaria* spp. se obtuvieron de hojas provenientes de las mismas zonas en las que se tomaron las muestras de suelo. La recolección y procesamiento de muestras se hizo entre los meses de abril y julio de 2015.

Obtención de *Bacillus subtilis*

Se pesó 10 g de cada muestra de suelo y se realizaron diluciones en suero fisiológico estéril hasta obtener la dilución 10⁻³. Posteriormente con un asa microbiológica se sembró en cajas Petri con medio Plate Count agar (PCA) + púrpura de bromocre-

¹ Grupo de Investigación BIOARN. Universidad Politécnica Salesiana. Quito-Ecuador.

sol y se incubó a 37°C por 48 h, se seleccionaron las cajas con UFC con características macroscópicas de *Bacillus sp.*

Las cajas con consideradas como posibles contenedoras de *B. subtilis* fueron resemebradas, en agar nutritivo y se incubó a 37°C por 48 h. Una vez identificadas macroscópicamente, se procedió a identificar microscópicamente mediante tinción con azul de metileno para identificar la morfología de un bacilo y tinción con verde brillante para la distinción de esporas centrales típicas de *B. subtilis*.

La identificación bioquímica se realizó mediante el kit Microgen BACILLUS-ID MID-66 siguiendo las indicaciones de fábrica. Las cepas caracterizadas fueron almacenadas empleando el sistema de conservación de cepas CRYOBANK a -20 °C.

Obtención *Alternaria spp.*

De la muestra vegetal infectadas con *Alternaria spp.* se procedió a recortar en la zona en la cual se desarrolló el micelio del hongo, se sembró en medio Agar Papa Dextrosa (PDA) y se incubó a 27° C con exposición a la luz alrededor de 4 días. Se seleccionaron los hongos que presentaron coloración verde oscuro, borde irregular, superficie plana polvosa algodonosa, características macroscópicas del género *Alternaria*⁴.

Para la caracterización morfológica microscópica se realizó una impronta con azul de lactofenol y se observó en el microscopio, se utilizó la clave de identificación de hongos y fitopatógenos comunes⁵.

Pruebas de Antagonismo

Las pruebas de antagonismo se realizaron utilizando la técnica de cultivos duales⁷. En cajas Petri con medio PDA se procedió a sembrar discos de *Alternaria spp.* de 5mm de diámetro de manera equidistante con ayuda de una plantilla, se inoculó *B. subtilis* en la caja con *Alternaria spp.* hundiendo el porta objetos en medio de la caja petri y se incubó a 24°C.

Se utilizó un control positivo (cepa ATCC 6633 *B. subtilis subsp. speizzenii*) y un testigo solo con *Alternaria spp.* En las pruebas duales se evaluó el crecimiento de *B. subtilis* a los siete días en cajas de Petri, así como el crecimiento de *Alternaria spp.*⁶.

Escala de Bell Competencia por sustrato

Para la evaluación de la capacidad antagónica se midió el tiempo que tardó en tener contacto el antagonista y el patógeno; durante 7 días cada 24 h se midió el crecimiento radial del antagonista y el patógeno; como referencia se utilizó la escala de Bell indicada en la tabla 1.

Se evaluó a los siete días utilizando la fórmula propuesta por Skidmore & Dickinson⁷.

$$PIC = \frac{[(C1-C2)]}{C1} \times 100$$

C1= Crecimiento radial del testigo

C2= crecimiento radial del fitopatógeno en los tratamientos de cultivo dual.

Análisis estadístico

Se evaluó las cepas encontradas con 14 repeticiones en un DCA, la evaluación se realizó a través de un ADEVA de una vía y pruebas Post Hoc de Tukey 5%, en el programa Infostat versión 2013.

Resultados

Obtención *Alternaria spp.*

El hongo perteneciente a la provincia de Imbabura presenta características macroscópicas similares a las descritas por Arias y Ramirez⁴ para el género *Alternaria spp.* Se determinó el resultado en la clave de la siguiente manera Clave IV: CC-Q-RR-UUU que corresponde *Alternaria spp.*, confirmándose la identidad del hongo como *Alternaria spp.*

Obtención de *Bacillus subtilis*

Se obtuvieron un total de 28 cepas aisladas candidatas de *B. subtilis*, la caracterización microscópica de los 28 microorganismos aislados se basó en las siguientes características: Bacilos Gram positivos de aproximadamente 0,8 mm de diámetro por 2 a 3 mm de largo con bordes redondeados, *B. subtilis* presentan esporas esféricas y centrales que no deforman el bacilo, de esta manera se obtuvo 14 microorganismos aislados, cuyas características que coincidieron con las definidas por Realpe et al.⁸

Pruebas bioquímicas API para *Bacillus subtilis*

La tabla 2 muestra la confirmación de la identidad mediante pruebas macroscópicas, microscópicas y bioquímicas, esta última mediante la prueba Microgen Bacillus-ID, encontrándose 7 cepas de *B. subtilis* con ayuda del software Microgen Identification System.

Tabla 1. Escala de Bell para evaluar la competencia por sustrato *in vitro*¹⁶. Porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC)

Clase	Descripción	Calificación	Rango
1	El antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno	Muy bueno	=60 mm
2	El antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo	Bueno	<60 mm y =40mm
3	El antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno parece dominar al otro	Deficiente	<40 mm y =30mm
4	El patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando tres cuartas partes de la caja Petri	Malo	< 30 mm y > 0
5	El agente fitopatógeno llega a cubrir totalmente caja de Petri.	Muy malo	= 0

Códigos	Provincia	Identificación
IB-6	Imbabura	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>licheniformis</i>
AB-3	Tungurahua	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>licheniformis</i>
AB-4	Tungurahua	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>licheniformis</i>
AB-10	Tungurahua	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>licheniformis</i>
CT-5	Cotopaxi	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>licheniformis</i>
CT-8	Cotopaxi	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>pumilis</i>
CT-11	Cotopaxi	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>

Tabla 2. Cepas pertenecientes al género *Bacillus subtilis* aisladas de tres provincias productoras de brócoli en Ecuador.

Pruebas de Antagonismo

Análisis Estadístico

En el ADEVA existió diferencia en al menos uno de los tratamientos en el crecimiento de *B. subtilis* con un ($p < 0,001$). Se diferenciaron cinco rangos de significación para el crecimiento de *B. subtilis* frente a *Alternaria* spp. como se indica en la Figura 1. En el rango E se ubica la cepa ATCC 6633 con un crecimiento promedio de 17,60 mm; seguido de la cepa AB-4 en el rango DE con un crecimiento promedio de 13,78 mm; valores de crecimiento altos en comparación con el resto de cepas, indicando que AB-4 y ATCC 6633 pueden desarrollarse en presencia de *Alternaria* spp.

De igual forma se establecieron diferencias significativas en el crecimiento de *Alternaria* spp. con un ($p < 0,001$), se diferenciaron seis rangos de significación mostrados en la Figura 2.

En el rango A se ubicaron los tratamientos que contenían las cepas AB-4 y ATCC 6633 con valores promedio de crecimiento de *Alternaria* spp. bajos en comparación al resto de tratamientos, indicándonos que existió actividad antagonista de *B. subtilis*.

Escala de Bell competencia por sustrato

En la tabla 3 se muestra los valores obtenidos para la Escala de Bell.

Según la escala de Bell la cepa AB-4 con un valor promedio de 45,21 y la cepa ATCC 6633 con un valor promedio de 58,64, se ubicaron en la clase 2 considerada como buena dentro de la escala para antagonismo.

Porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC)

La cepa AB-4 presentó el valor más alto de inhibición de crecimiento con un PIC de 58%, seguido por la cepa ATCC 6633 que presentó un PIC de 52%, valores superiores al resto de cepas como se aprecia en la Tabla 4, también se observan diferencias significativas entre las diferentes cepas.

Discusión

Se demuestra así que la cepa *B. subtilis* presentan actividad antagonista por competencia, puesto que este género de bacterias al ser también promotoras de crecimiento vegetal compite por la

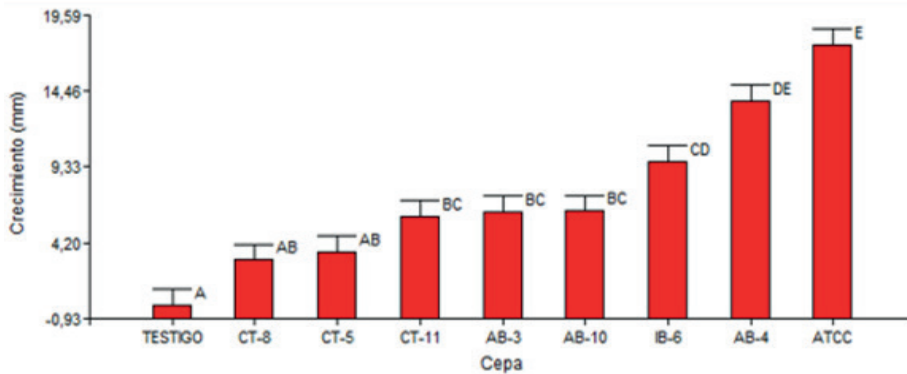


Figura 1. Prueba Tukey 5% para el crecimiento en milímetros de las diferentes cepas de *B. subtilis* en pruebas duales con *Alternaria* spp.

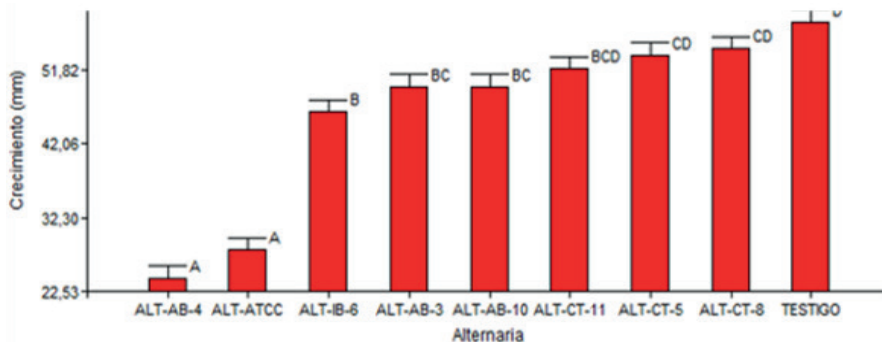


Figura 2. Prueba Tukey 5% para el crecimiento en milímetros de *Alternaria* spp. en pruebas duales con *B. subtilis*

Tabla 2. Valores crecimiento (mm) al séptimo día de *Bacillus subtilis* y evaluación en la Escala de Bell.

Repetición	IB-6	ATCC	CT-11	CT-8	AB-3	AB-4	AB-10	CT-5
1	34	57	-	19	17	57	23	-
2	32	60	30	-	71	32	44	-
3	36	56	-	-	51	47	30	36
4	34	49	37	13	-	43	42	8
5	35	66	33	-	31	53	34	32
6	30	60	-	28	-	35	17	7
7	38	83	18	-	31	44	26	-
8	32	49	-	19	20	32	29	-
9	35	53	-	29	20	45	11	28
10	31	74	23	-	33	47	27	17
11	31	73	32	18	-	46	-	-
12	24	45	30	-	-	54	13	-
13	21	39	20	-	-	47	-	23
14	37	57	57	17	20	51	-	17
Promedio	32,14	58,64	31,11	20,43	32,67	45,21	26,91	21,00
Clase	3	2	3	4	3	2	4	4

Tabla 2. Valores porcentuales de inhibición del crecimiento de *Alternaria spp.* por cepas de *Bacillus subtilis*.

CEPAS	Porcentaje de inhibición de crecimiento
AB-4	58
ATCC 6633	52
IB-6	20
AB-3	15
AB-10	15
CT-11	10
CT-5	8
CT-8	6

adquisición de nutrientes, siendo el mecanismo mediante el cual actúa *B. subtilis*, es competir por uno de los nutrientes esenciales en desarrollo de cualquier organismo como lo es el hierro (Fe^{3+}). Tejera et al.⁹

Estudios de esta bacteria plantean que los sideróforos producidos por *B. subtilis* tienen mayor afinidad por los compuestos de hierro¹⁰. Por lo tanto, el agente patógeno que compite con *B. subtilis* por el hierro de manera ineficiente, es un patógeno cuyo desarrollo se ve afectado pudiendo ser en este caso el de *Alternaria spp.*, además de que la deficiencia de este elemento afecta a su sistema enzimático¹¹ impidiéndole sintetizar micotoxinas necesaria para ejercer su acción patogénica.

La capacidad antagónica de *B. subtilis* radica principalmente en su capacidad de producir distintos metabolitos con capacidad antifúngica y antibacteriana, dentro del grupo de metabolitos antifúngicos se encuentran las surfactinas, fengicinas e iturinas; además de una gran variedad de enzimas líticas entre las cuales se destacan lipasas, proteasas y β glucanasas^{9,12,13}.

Sin embargo, el mecanismo de antibiosis utilizado por *B. subtilis* involucra la interacción de más de uno de estos metabolitos para ejercer su actividad fungicida biocontroladora,

además de la especificidad que posea contra el patógeno. La familia de las surfactinas no son sustancias con actividad fungicida, estas muestran actividad antifúngica en sinergismo con iturina A; a diferencia de las iturinas, ya que estas muestran actividad antifúngica e inhibitoria contra una gran variedad de patógenos, las fengicinas presentan actividad fungitóxica fuerte, especialmente contra hongos filamentosos^{3,13}. Hecho que explica el bajo valor de PIC que obtuvieron el resto de cepas, es por ello que resulta razonable pensar que la cepa AB-4 y ATCC 6633 presentaron mayor concentración, mejor interacción y especificidad de los metabolitos secretados contra el patógeno a diferencia del resto de cepas que a pesar de haber secretado estos metabolitos no mostraron interacción entre estos o no tuvieron afinidad contra el patógeno.

La variabilidad de la acción antagonista entre las diferentes cepas se debe a que esta actividad es muy cambiante entre microorganismos, ya que estos se expresan dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, entre otros factores¹⁴.

Conclusiones

Las cepas aisladas de *B. subtilis* mostraron capacidad antagónica en las pruebas *in vitro* realizadas contra el hongo fitopatógeno *Alternaria spp.*, ya que el crecimiento del patógeno *Alternaria spp.* se vio afectado significativamente con un PIC de 58% y 52%, demostrando que la *B. subtilis* posee potencial como controlador biológico contra el hongo fitopatógeno *Alternaria spp.*

Se determinó que el tratamiento AB-4 (cepa nativa) es la mejor cepa con capacidad antagónica ya que obtuvo los mejores resultados, ubicándose en Clase 2 según la escala de Bell y en el rango A de la prueba de Tukey al 5%, incluso llegando a superar al control positivo que fue la cepa ATCC 6633.

Referencias bibliográficas

1. Fraire M., & Nieto D. (2010). *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* Hongos Causantes de la Pudrición del Florete de Brócoli. Retrieved Enero 2016, from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092010000100003&lng=es&tlng=es.
2. Cadena D. (2011). Efecto de tres dosis en tres épocas de aplicación de pyraclostrobin (COMET®) en el control de la mancha. (Tesis, Universidad Técnica de Cotopaxi). Retrieved Febrero 2016, from <http://repositorio.uto.edu.ec/bitstream/27000/775/1/T-UTC-0598>
3. Yáñez V. (2012). Potencial de la cepa CPA-8 de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta. Lleida: (Tesis, Universitat de Lleida). Retrieved from <http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/80456/Tvrym1de1.pdf?sequence=1>
4. Arias J., & Ramirez A. (2008). Elaboración de un atlas para la descripción macroscópica y microscópica de hongos fitopatógenos de interés en especies de flores de corte cultivadas en la sabana de Bogotá. Quito: (Tesis, Pontificia Universidad Javeriana). Retrieved Noviembre 2015, from <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis223>
5. Gepp V. (2009). Curso de Fitopatología. Retrieved Diciembre 2015, from http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursos/fitopato/practicas/Clave_hongos.pdf
6. Acurio R. (2007). Aislamiento, caracterización y pruebas de eficiencia *in vitro* y bajo invernadero de Cepas de *Bacillus subtilis* para Control de *Phytophthora infestans* con el fin de establecer un banco de microorganismos benéficos. Quito: Tesis. Retrieved 2015 Diciembre, from <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/2564>
7. Skidmore A., & Dickinson, C. (1976). Colony interactions and hyphal interference between *Septoria Nodorum* and phylloplane fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 57-64. Retrieved Enero 2016, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007153676800927>
8. Realpe M. E., Hernández, C. A., & Agudelo, C. I. (2002). Revista biomédica. Retrieved Febrero 2016, from *Especies del género Bacillus: Especies del género Bacillus: morfología macroscópica y microscópica*: <http://www.revistabiomedica.org>
9. Tejera B., Rojas M., & Heydrich M. (2011, Diciembre). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 131-138. Retrieved Febrero 2016, from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181222321004>
10. Robles A. (2011). Evaluación de microorganismos antagonistas y sustancias naturales en el control de enfermedades foliares en tomate. 20-21. Cuba: Universidad Central Marta Abreu de las Villas. Retrieved Diciembre 2015, from <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/335>
11. Benavides A. (2008). Fisiología, Absorción y Asimilación de Hierro en las Plantas. Retrieved Enero 2016, from http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/hierro_en_plantas.pdf
12. Layton C., Maldonado E., Monroy L., Corrales L., & Sánchez L. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. 177-187. Bogotá, Colombia: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Retrieved Enero 2016, from http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA16_ARTREVIS1_BACILLUS.pdf
13. Yesid A., & Sánchez L. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. Retrieved Septiembre 2015, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702012000200002
14. Calvo J., Rivera G., Orozco S., & Orozco R. (2012). *Agronomía Mesoamericana*. 225-231. doi:<http://dx.doi.org/10.15517/am.v23i2.6481>

Recibido: 19 diciembre 2017

Aprobado: 20 febrero 2018

RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

Prueba de Semmes Weinstein en radiculopatía Semmes Weinstein test in radiculopathy

Danilo Ruiz Reyes¹, María Elena Romo², Hugo Pereira Olmos³

DOI. 10.21931/RB/2018.03.02.9

Resumen: La prueba de Semmes Weinstein o de monofilamento utilizada para la valoración de los pacientes con neuropatía diabética periférica, puede ser replicada para la evaluación diagnóstica en pacientes con hernias discales con compromiso neuropático periférico (radiculopatía) debido a hernias discales a nivel lumbar. Se evidencio que la prueba fue positiva para radiculopatía en 26 pacientes (87 %), en 4 pacientes (13 %) la prueba fue negativa a pesar de que los pacientes tenían signos radiculopáticos ratificados por MRI.

Palabras clave: monofilamento, hernias discales, Semmes Weinstein.

Abstract: Semmes Weinstein or monofilament test, used to evaluate patients with diabetic peripheral neuropathies, can be applied on the diagnostic evaluation and monitoring of patients with lumbosacral disc herniation and peripheral neuropathy (radiculopathy). In conclusion, this simple, low cost and high sensitive test allows a diagnosis (86,7% of cases) of peripheral neuropathy due to root compression by herniated discs.

Key words: monofilament, disc herniation, Semmes Weinstein.

612

Introducción

La prueba de Semmes Weinstein o de monofilamento utilizada en la valoración de la neuropatía diabética periférica en la cual tiene una sensibilidad del 97% y una especificidad del 83 %, puede ser replicada para la evaluación diagnóstica en los pacientes con hernias discales lumbosacras con compromiso neuropático periférico (radiculopatía)¹⁻⁵.

En el examen físico específico de los pacientes con hernia de disco a nivel lumbar se deben practicar diversos procedimientos semiológicos (que se están descuidando en la actualidad), uno de ellos es la prueba de monofilamento o de Semmes Weinstein (sensibilidad táctil cutánea) la que debe efectuarse en la valoración inicial de todo paciente con radiculopatía, aunque lamentablemente en nuestro medio poco se la utiliza.

En la misma, se recurre a un estesiómetro especial de nylon denominado monofilamento que al doblarse, ejerce una presión constante de 10 gramos, independiente de la fuerza con la que se lo use, se aplica en once sitios específicos pre-establecidos en los pies, valorando la presencia o ausencia de esta sensibilidad expresada verbalmente por los pacientes y logrando con ello corroborar la ubicación de la discopatía. La prueba permite valorar la sensibilidad táctil en dermatomas específicos inervados por las raíces nerviosas lumbares L4, L5 y S1⁶⁻¹⁰.

Un paciente se considerará sin afección neuropática cuando la puntuación obtenida sea de 11/11, lo cual evidencia que la sensibilidad táctil esta mantenida y con ello se descartaría la afección neuropática. (Fig. 1,2)¹¹⁻¹³.

Materiales y métodos

En el análisis se incluyeron 30 pacientes (15 hombres y

15 mujeres), atendidos en el Centro Médico Ozonocenter de Quito, Ecuador; en el transcurso tres meses (enero a marzo 2017), diagnosticados con hernias discales a nivel L5-S1; con signos clínicos específicos de radiculopatía (dolor lumbociático, parestesias de miembros inferiores) y confirmado por Resonancia Magnética simple de columna lumbo sacra.

Resultados y discusión

Los resultados indican que la muestra corresponde a 30 personas, de 20 a 60 años, promedio de edad 43,8; sin diferencia estadística entre el grupo de hombres y mujeres. (Tabla 1)

Solamente 4 personas (13,3%) tuvieron una prueba negativa (sensibilidad táctil indemne) y 26 pacientes (86,7 %) tuvieron una prueba positiva, confirmatoria de radiculopatía (neuropatía).

No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de hombres¹ y mujeres³, que presentaron prueba negativa, tampoco hubo diferencia significativa entre el grupo de personas menores a 44 años², y mayores de 44 años², que presentaron prueba negativa (p mayor a 0.05).

Conclusiones

Se puede concluir que esta prueba permite realizar un diagnóstico precoz (86,7 % de los casos) de neuropatía periférica debido a compresión radicular por hernias discales, constituyéndose en una prueba simple, de mínimo costo y de gran sensibilidad, siendo de gran utilidad especialmente en localidades donde no se dispone de medios diagnósticos que impliquen el uso de alta tecnología para esta frecuente patología.

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

² Ozonocenter, Quito, Ecuador.

³ Docente Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica, Quito, Ecuador.

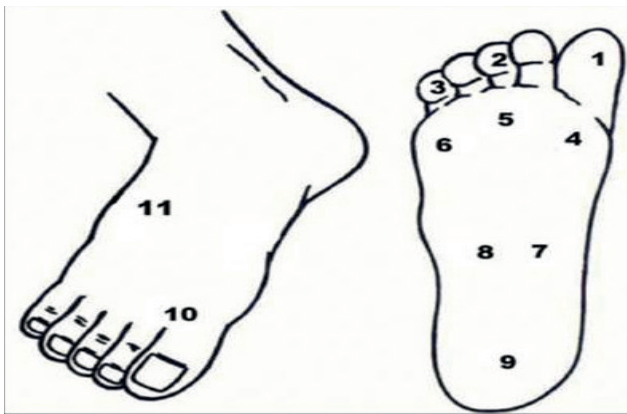


Figura 1. Ubicación puntos prueba Semmes Weinstein



Figura 2. Prueba Semmes Weinstein

	Casos	Prueba Negativa	Prueba negativa %	Prueba Positiva	Prueba Positiva %
HOMBRES	15	1	6,7	14	93,3
MUJERES	15	3	20,0	12	80,0
TOTAL	30	4	13,3	26	86,7

Tabla 1. Distribución por género y resultados de la muestra Prueba de Semmes Weinstein

Referencias bibliográficas

- Yang Z, Zhang Y, Chen R, Huang Y, Ji L, Sun F, et al. Simple tests to screen for diabetic peripheral neuropathy (Protocol). Cochrane Libr. 2014;(2):1-31.
- Torres M CG. Prueba Monofilamento en Neuropatía Diabética. Tesis Grado PUCE, Quito, Ecuador. 2015;1-90.
- Ticse R; Pimentel R MPVJ. Elevada frecuencia de neuropatía periférica en pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 de un hospital general de Lima-Perú. Rev Med Hered. 2013;114-21.
- Paiva, OM; Rojas N. Pie Diabético: ¿Podemos Prevenirlo? Rev Médica Clínica Las Condes [Internet]. 2016;27(2):227-34. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0716864016300128>
- Manrique. LM. Prevalencia de neuropatía periférica en diabéticos tipo 2 en el primer nivel de atención. Inst Mex Segur Soc. 2012;1126-31.
- Claudia de Souza Fortaleza A, Rezende Martinelli A, Jeanne Lourenço Nozabiel A, Madia Mantovani A, Regina de Camargo M, Elena Prado Teles Fregonesi C, et al. Avaliação da Sensibilidade Em Indivíduos Com Diabetes Melito. Colloq Vittae [Internet]. 2010;2(2):44-9. Available from: <http://revistas.unoeste.br/revistas/ojs/index.php/cv/article/viewFile/556/364>
- Ibarra C., Rocha J. et al. [Prevalence of peripheral neuropathy among primary care type 2 diabetic patients]. Rev Med Chil [Internet]. 2012;140(9):1126-31. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872012000900004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes - 2008. Diabetes Care. 2008;31(SUPPL. 1).
- Dros J, Wewerinke A, Bindels PJ, Weert HC Van. Accuracy of Monofilament Testing to Diagnose Peripheral Neuropathy: Ann Fam Med. 2009;7(6):555-8.
- Hirschfeld G, von Glischinski M, Blankenburg M, Zernikow B. Screening for Peripheral Neuropathies in Children With Diabetes: A Systematic Review. Pediatrics [Internet]. 2014;133(5):1324-30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24709928>
- Feng Y, Schlösser FJ, Sumpio BE. The Semmes Weinstein monofilament examination is a significant predictor of the risk of foot ulceration and amputation in patients with diabetes mellitus. J Vasc Surg [Internet]. 2011;53(1):220-226.e5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2010.06.100>
- Boulton AJM, Armstrong DG, Albert SF, Frykberg RG, Hellman R, Kirkman MS, et al. Comprehensive foot examination and risk assessment. Diabetes Care. 2008;31(8):1679-85.
- Wilasrusmee C, Suthakorn J, Guerineau C, Itsarachaiyot Y, Sa-Ing V, Proprom N, et al. A novel robotic monofilament test for diabetic neuropathy. Asian J Surg [Internet]. 2010;33(4):193-8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1015-9584\(11\)60006-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1015-9584(11)60006-7)

Recibido: 15 septiembre 2017

Aprobado: 20 enero 2018



CASE REPORTS / REPORTE DE CASO

Enterocolitis necrotizante. presentación de dos casos clínicos. Necrotizing enterocolitis. presentation of two clinical cases.

Nathaly Lapo¹, Fausto Vásquez², Pablo Olmedo³.

DOI. 10.21931/RB/2018.03.02.10

Resumen: La enterocolitis necrotizante (ECN) es la emergencia gastrointestinal más frecuente y grave del recién nacido, afectando especialmente a los prematuros y los de muy bajo peso al nacer (< 1500 gr). Se reporta que afecta del 1 a 5 % de todos los recién nacidos ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales con una tasa de mortalidad del 10 al 50%. Presentamos dos casos de ECN tratados en la unidad de cuidados intensivos de neonatología del Hospital IESS Ibarra, cuyos factores de riesgo principales fueron la prematuridad y el bajo peso y se les inició un tratamiento agresivo de sostén que evitó mayores complicaciones.

Palabras clave: Enterocolitis Necrotizante, Prematuro, Bajo peso al nacer, Tratamiento.

Abstract: Necrotizing enterocolitis (ECN) is the most frequent and severe gastrointestinal emergency in newborns, especially affecting newborns preterm and very low weight at birth (<1500 g). It is reported that affects 1-5% of all newborns admitted to the Neonatal Intensive Care Unit with a mortality rate of 10 to 50%. We present two cases of NEC treated in the intensive care neonatology of Hospital IESS Ibarra, whose main risk factors were prematurity and low birth weight at birth and were initiated an aggressive supportive treatment that avoided more complications.

Key words: Necrotizing enterocolitis, Prematurity, Low weight at birth, Treatment.

Introducción

La ECN en Ecuador en el año 2013 según el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) se encontró entre las principales causas de mortalidad infantil con 34 casos correspondiendo al 1,16%¹.

La ECN, es una enfermedad de etiología multifactorial, caracterizada por edema, ulceración y necrosis de la mucosa intestinal y sobreinfección bacteriana de la pared ulcerada. Estos factores terminan activando una cascada inflamatoria que lleva a una necrosis de la pared intestinal, con o sin perforación intestinal². La etiopatogenia de la enfermedad aún se desconoce, y se citan en su génesis la prematuridad, alimentación enteral, infección bacteriana, inmadurez del intestino, cuadros hipoxico – isquémicos, la isquemia gastrointestinal perinatal asociada a asfixia perinatal, la colonización bacteriana del intestino y la alimentación enteral precoz a base de fórmulas lácteas artificiales³.

La ECN está afectando a alrededor del 5% de todos los recién nacidos muy prematuros o de muy bajo peso al nacimiento (<1.500 g) y alrededor del 10% de todos los prematuros extremos o de peso extremadamente bajo al nacimiento (<1.000 g)². La prematuridad es un factor de riesgo firmemente correlacionado. La edad de aparición de la ECN varía en relación inversa con la edad gestacional y al peso al nacer, así su incidencia viene a ser de aproximadamente un 10% entre los recién nacidos de 25 semanas de edad gestacional y de un 0,03% entre los recién nacidos a término⁴.

Existen diversas clasificaciones para el ECN, la más aceptada mundialmente y que se utiliza es la clasificación de Bell⁵.

El cuadro clínico presenta signos gastrointestinales como distensión abdominal (70 – 98%), intolerancia a los alimentos con aumento del residuo gástrico (>70%), vómitos (>70%), hemorragia rectal (25-63%), sangre oculta en heces (22 - 59%),

diarrea (4-26%) y cambios sistémicos como inestabilidad de termorregulación, apnea, bradicardia^{6, 7}. El signo radiológico patognomónico es el gas intramural (neumatosis intestinal), que puede ser submucoso o subseroso, la región ileocecal es la porción más precoz y comúnmente afectada⁸. El neumoperitoneo es la única indicación absoluta de cirugía. El tratamiento médico consiste en medidas de soporte, reposo intestinal, suspender la alimentación enteral, descompresión gástrica, antibióticos sistémicos, asistencia respiratoria, nutrición parenteral y corrección de las alteraciones hematológicas y/o electrolíticas que pudieran estar presentes⁹.

Presentación de casos

Caso 1

Paciente recién nacida de sexo femenino. Madre de 29 años de edad, multigesta, tipo sanguíneo O Rh positivo, con diagnóstico de Preclamsia. Se realizó cesárea a las 32,6 semanas (prematuro moderado). Se realizó maduración pulmonar con corticoides antes del nacimiento. APGAR al nacimiento fue de 8 al minuto y de 9 a los 5 minutos de vida. Se realizó una reanimación superficial. Pesó al nacimiento 1350 g (peso muy bajo < 1500 g). En la primera hora de vida presentó dificultad respiratoria e hipoglicemia, por lo que se inicia asistencia respiratoria con CPAP de burbuja, se coloca vía umbilical, se inicia líquidos intravenosos. A las 24 horas de vida se coloca oxígeno por cánula nasal, se canaliza vía central y se inicia alimentación por sonda oro gástrica con calostro 5 cc cada 6 horas. El grupo sanguíneo del recién nacido es B Rh positivo. El cuarto día se inicia nutrición parenteral total (NPT) y se au-

¹ Servicio de Neonatología. Hospital del IESS Ibarra. Ecuador.

² Ozonocenter, Quito, Ecuador.

³ Docente Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica, Quito, Ecuador.

menta la dosis de alimentación oral a 7 ml. Neonato presenta ictericia zona de Kramer 2 se coloca a fototerapia con lo que las bilirrubinas alcanzan valores normales.

El sexto día el paciente presenta distensión abdominal, dibuja asas intestinales por lo que se decide suspender la alimentación enteral por 24 horas, deposición y diuresis normales. Se reinicia alimentación normal, el décimo día se llega a 10 ml de leche materna por sonda orogastrica, pero al duodécimo día el recién nacido presenta nuevamente distensión abdominal, deposición abundante y deja residuo gástrico de 10 ml por dos ocasiones en la sonda orogastrica, se decide suspender la alimentación, se realizan exámenes, con resultados de: Leucocitos 9.24/ml, Hemoglobina 16,6g/dl, Hematocrito 49,1%, Plaquetas 193/mm³, PCR de 4,69, sangre oculta en heces positivo, coprológico flora bacteriana aumentada, consistencia líquida. Se decide iniciar antibiótico inmediatamente vancomicina intravenosa 10mg/kg/dosis por 7 días y se realizó una radiografía de abdomen la que muestra edema interasas y aumento del gas intestinal, lo que confirma el diagnóstico de enterocolitis necrotizante (Figura 1).

Paciente evolucionó de forma favorable, no volvió a presentar distensión abdominal, exámenes posteriores normales, se reinicia alimentación enteral por la sonda oro gástrica, el día 20 de hospitalización se discontinuo NPT y se continua con alimentación enteral por vía oral por succión, con buena ganancia de peso, además se inicia plan canguro. A los 30 días de vida se le da el alta a paciente en condiciones estables y con un peso de 1575 gramos, con una ganancia de 200 gramos desde el nacimiento. Los diagnósticos de egreso de la hospitalización fueron: recién nacido pretermino moderado, peso muy bajo al nacimiento, dificultad respiratoria, enterocolitis necrotizante no perforada e incompatibilidad ABO.



Figura 1. Caso 1 Radiografía de abdomen simple anteroposterior, se observa dilatación de asas intestinales, edema de pared intestinal.

Caso 2

Paciente que nace 4 días después del primer caso, recién nacida de sexo femenino. Madre de 34 años de edad, multigesta, tipo sanguíneo A Rh positivo, el embarazo curso de manera normal, ruptura prematura de membranas 15 horas antes del parto. Se realizó maduración pulmonar con corticoides y se dio antibioticoterapia a la madre. Se realizó parto cefalovaginal a las 30 semanas de edad gestacional (prematuro extremo). APGAR de 8 al minuto y de 9 a los 5 minutos de vida. Pesó al nacimiento 1740 g (peso bajo < 2000 g). En la primera hora presentó signos de dificultad respiratoria, por lo que se inicia asistencia respiratoria con CPAP de burbuja, líquidos intravenosos y antibiótico terapia (ampicilina 100mg/kg/dosis y amikacina 15 mg /kg/día). El grupo sanguíneo del recién nacido es O Rh positivo. Se coloca vía umbilical y a las 24 horas de vida se inicia alimentación enteral por sonda orogastrica, pero a las 41 horas de vida paciente presenta distensión abdominal y dibuja asa intestinal por lo que se suspende alimentación. El sexto día se llega a dar 10 ml de leche materna por sonda orogastrica cada 3 tomas y el séptimo día paciente presenta apnea por una ocasión, deja residuo de 3 ml por sonda orogastrica y hace deposiciones líquidas abundantes de mal olor, por lo que se decide suspender la alimentación y realizar exámenes: leucocitos 10,2/ml, hemoglobina 15,2g/dl, hematocrito 41,7%, plaquetas 151 /mm³, sangre oculta en heces positivo, coprológico heces color negruzca, aspecto mucoso, flora bacteriana disminuida, consistencia líquida, Polomorfonucleares 25%. Se decide iniciar antibiótico terapia con vancomicina 10mg/kg/dosis y se pide una placa de abdomen la cual indica edema interasas con signos de gas intramural (Figura 2), lo que confirma el diagnóstico de ECN.



Figura 2. Caso 2 Radiografía de abdomen simple anteroposterior, se observa dilatación de asas intestinales, edema de pared intestinal.

Paciente evoluciona favorablemente ya no deja residuo gástrico, no presentó distensión abdominal, deposición y diuresis normales, se inicia con alimentación por succión además se inicia plan canguro. A los 27 días de vida se decide el alta paciente en condiciones estables, con un peso de 1740 gramos, el mismo peso al nacimiento. Los diagnósticos al egreso hospitalarios son: recién nacido prematuro extremo, peso bajo al nacimiento, dificultad respiratoria y enterocolitis necrotizante no perforante.

Discusión

En la ECN varios grupos han sugerido que para los recién nacidos, la prematuridad es el único factor perinatal que se relaciona con un mayor riesgo de ECN⁴. También se conoce que mientras menor es el peso al nacimiento y la edad gestacional, mayor es la incidencia y la gravedad de esta enfermedad. En los recién nacidos preterminos < 33 semanas de edad gestacional, la ECN aparece en un promedio de 7 días (inicio temprano) en recién nacidos más maduros y se retrasa 32 días (inicio tardío) en recién nacidos prematuros con edad gestacional más inferior y con peso extremadamente bajo al nacimiento (< 1000 gr), lo que indica que la etiopatogenia es distinta en ambos grupos y se necesitan más estudios para comprender la etiología de esta enfermedad^{4, 10}. En el primer caso el recién nacido pretermino de 32 semanas con peso de 1350 g los síntomas aparecen al décimo día y en el segundo caso el recién nacido pretermino de 30 semanas con peso de 1740 g semanas los síntomas y el diagnóstico se realizaron al séptimo día de vida, concordando con la bibliografía.

Otro punto a tratar es la alimentación trófica o alimentación enteral mínima que se ha visto como un factor de prevención de la ECN. Un meta análisis sobre el efecto de la alimentación enteral mínima en la incidencia de enterocolitis necrosante no mostró diferencia significativa con los niños que no la recibieron. Estudios que comparan el inicio temprano de la vía enteral entre (2 y 4 días) con el inicio tardío (entre 5 y 10 días) no encontraron diferencias en cuanto a la aparición de enterocolitis necrosante¹¹ y la administración de pequeñas cantidades (de 5 a 20 ml/kg/día) desde el primer día ha demostrado que no incrementa el riesgo de enterocolitis^{12, 13}. En los casos expuestos se inició alimentación enteral a las 24 horas de vida con leche materna, en pequeñas cantidades 4 ml y aunque los estudios demuestran que el aumento progresivo de cantidad de leche materna es seguro, en los dos casos clínicos la enterocolitis necrotizante se inició justo después de aumentar la dosis de leche materna.

Cabe recalcar que en el primer caso la madre del recién nacido tuvo diagnóstico de preclamsia y en el segundo caso un diagnóstico de ruptura prematura de membranas. En dos estudios de cohorte, encontraron a la preclamsia como un factor de riesgo y estadísticamente significativo para ECN¹⁴ y en una revisión sistemática se mostró a la enfermedad hipertensiva del embarazo como un factor de riesgo para ECN².

En la presentación clínica de los casos, se detectaron síntomas como distensión abdominal, residuo gástrico, sangre oculta en heces, apneas y los hallazgos radiológicos en abdomen fueron neumatos intestinal. La descripción clínica y radiológica de los dos casos clínicos expuestos clasifica la Enterocolitis Necrotizante en estadio II A (ECN Leve)³.

El pronóstico ha mejorado significativamente gracias al tratamiento agresivo inicial y a la mejor elección del momento de la intervención quirúrgica. En alrededor del 70% de los casos, el tratamiento no es quirúrgico. El curso inicial del tra-

tamiento en estadio de ECN I, II o ante la sospecha de ECN hay que interrumpir inmediatamente la alimentación y descomprimir el intestino con una sonda nasogástrica e iniciar antibióticos de amplio espectro durante 7 a 14 días con un promedio de 10 días¹⁵.

No hay pruebas suficientes para recomendar un régimen antibiótico particular para el tratamiento de ECN¹⁶. Los regímenes de antibióticos potencialmente útiles para el tratamiento médico de ECN incluyen ampicilina, gentamicina y metronidazol; ampicilina, cefotaxima y metronidazol; o con vancomicina se utiliza en lugar de ampicilina en sospecha de *Staphylococcus Aureus* resistente a la meticilina, infección por enterococos resistentes a la ampicilina y especies de estreptococos¹⁵. El régimen con vancomicina se ha usado en el 59% de los pacientes con ECN¹⁷. Se debe considerar una cobertura más amplia (vancomicina y cefotaxima) en los prematuros (< 2.200g) sobretodo cuando no se observa respuesta a los regímenes estándar¹⁵. Como algunos brotes de enterocolitis necrotizante pueden tener una causa infecciosa, se recomienda aislar a los lactantes con enterocolitis, en los casos expuestos ambos fueron ubicados en una habitación de aislamiento¹⁶.

En nuestra unidad en los casos indicados después de tener la sospecha clínica y los datos de laboratorio, se inició inmediatamente un antibiótico agresivo con la vancomicina, ya que es de suma importancia un tratamiento médico precoz para evitar complicaciones e incluso la muerte, dada la mala evolución de la enfermedad cuando está en estadios más avanzados y la falta de opciones quirúrgicas en muchos hospitales del país. Como conclusión el paciente con ECN, dependiendo de su estadio inicial y de su evolución clínico-radiológica, puede requerir diversos manejos, lo cual resalta la importancia de evaluar periódicamente la condición clínica de los pacientes sobre todo pre términos extremos (< 32 semanas de gestación).

Referencias bibliográficas

1. Usiña Jhon, Carrera Soledad. Anuario de estadísticas vitales nacimientos y defunciones 2013. Dirección de estadísticas Sociodemográficas. 2013
2. Patel Bhoomika, Shah Jigna. Necrotizing Enterocolitis in Very Low Birth Weight Infants: A Systemic Review. ISRN Gastroenterol. 2012.
3. Guasch Demestre X., Torrent Raspall F. Enterocolitis Necrosante. Servicio de Pediatría y Neonatología SCIAS. Hospital de Barcelona. 2008.
4. Gregory Katherine E., DeForge Christine E., Natale Kristan M., Phillips Michele and Van Marter Linda J. Necrotizing Enterocolitis in the Premature Infant. Neonatal Nursing Assessment, Disease Pathogenesis, and Clinical Presentation. Adv Neonatal Care. 2011 Jun; 11(3): 155-166.
5. Coppola Christopher P. Necrotizing Enterocolitis Pediatric Surgery 2014, pp 123-126
6. Dimmitt Reed, Moss Lawrence, et al. Clinical Management of Necrotizing Enterocolitis. Neoreviews 2001; 2:e110-e117
7. Neu Josef, Walker Allan W. Necrotizing Enterocolitis. N Engl J Med 2011;364:255-64.
8. Epelman Monica, Daneman Alan, Navarro Oscar, Morag Iris, et al. Necrotizing Enterocolitis: Review of State-of-the-Art Imaging Findings with Pathologic Correlation. RadioGraphic. RSNA Education Exhibits March-April 2007.
9. Springer Shelley C, Annibale David J, Rosenkrantz Ted, et al. Necrotizing Enterocolitis Treatment & Management Medscape.Updated: Nov 10, 2014.
10. Wendy H. Yee, Amuchou Singh Soraisham, Vibhuti S. Shah, Khalid Aziz, Woojin Yoon, Shoo K. Lee, and the Canadian Neonatal Network. Incidence and Timing of Presentation of Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants. PEDIATRICS Print, 0031-4005, Oct 11,

- 2011.
11. Morgan J, Young L, McGuire W. Slow advancement of enteral feed volumes to prevent necrotising enterocolitis in very low birth weight infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013, Issue 3. Art. No.: CD001241.
 12. McGuire W, Bombell S. Slow advancement of enteral feed volumes to prevent necrotising enterocolitis in very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008 Apr 16 ;(2):CD00124.
 13. Rabago M, Brito L, Castillo R, Morales M. Alimentación Enteral del Recién Nacido Prematuro Menor o Igual a 32 semanas de edad gestacional. México: Secretaria de Salud; 2010. www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html.
 14. Zalapa D, Gomez A, Alvarez C. Early hebdomadal complications in newborns from mothers with both mild and severe preeclampsia. *Ginecol Obstet mex* 2003; 71: 238-43
 15. Tickell David, Duke Trevor. Evidence behind the WHO guidelines: Hospital Care for Children: For Young Infants with Suspected Necrotizing Enterocolitis (NEC), What is the Effectiveness of Different Parenteral Antibiotic Regimens in Preventing Progression and Sequelae? *Journal of tropical pediatrics*, vol. 56, NO. 6, 2010.
 16. Shah D, Sinn JKH. Antibiotic regimens for the empirical treatment of newborn infants with necrotising enterocolitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012, Issue 8. Art. No.: CD007448.
 17. Olson Jared, Luke Jake, Blaschke Anne, Faix Roger and Thorell Emily. Antibiotic Utilization in Necrotizing Enterocolitis at a Pediatric Tertiary Care Center. Department of Pediatrics, Division of Pediatric Infectious Diseases, University of Utah School of Medicine. 2011.

Recibido: 3 febrero 2018

Aprobado: 10 abril 2018

REVIEW / ARTÍCULO DE REVISIÓN

Condiloma acuminado. Situación actual. Condyloma acuminata. Current situation.

Adrian Isacc Nieto Jiménez.

DOI. 10.21931/RB/2018.03.02.11

Resumen: El condiloma acuminado prevalece en la población mundial elevando su incidencia en los últimos años; afectando sobre todo a la población sexualmente activa. Representa sin dudas un gran problema médico y psicológico a quienes lo padecen. Su incidencia se ha incrementado en los últimos años en países del primer mundo y en países en vías de desarrollo. Se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva y actualizada acerca de esta entidad, enfatizando en la importancia de la prevención, terapéutica y posibles complicaciones a largo plazo. La infección por el Virus del Papiloma Humano es una de la ITS con mayor prevalencia aun a pesar de no conocerse con exactitud debido al sub-registro epidemiológico existente. A través del tiempo se han desarrollado una diversidad de tratamientos que van desde el quirúrgico hasta terapias más recientes como los inmunomoduladores y la terapia fotodinámica.

Palabras clave: condiloma acuminado, epidemiología, factores de riesgo, transmisión.

Abstract: Condyloma acuminata prevails in the world population increasing its incidence in recent years; particularly affecting the sexually active population. Undoubtedly represents a great medical and psychological problem for those who suffer. Its incidence has increased in recent years in first world countries and in developing countries. An exhaustive and updated bibliographic review was done about this entity, emphasizing the importance of prevention, therapeutics and possible long-term complications. Human papillomavirus (HPV) infection is one of the most prevalent STIs even though it is not known precisely because of the existing epidemiological underreporting. Over time, a variety of treatments have been developed ranging from surgical to more recent therapies such as immunomodulators and photodynamic therapy.

Key words: condyloma acuminata, epidemiology, risk factors, transmission.

Introducción

Las Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) comprenden todas aquellas infecciones en las que la transmisión sexual tiene importancia epidemiológica y constituyen en la actualidad el grupo de infecciones más frecuentes en muchos países del mundo, sus complicaciones incluyen efectos tan graves como cáncer, demencia y muerte^{1, 2}. La infección por el Virus Papiloma Humano (VPH) representa en estos tiempos una de las principales ITS, y es reconocida como la más frecuente en el mundo, su prevalencia puede alcanzar hasta un 60 por ciento en las personas sexualmente activas^{3, 4}.

La condilomatosis genital o verruga genital externa (VGE) es una ITS altamente contagiosa, causada por el VPH. Este virus infecta el epitelio basal a través de micro traumas de la piel/ mucosa ano-genital y mucosa oral^{5, 6}. Los VPH pertenecen a la familia Papovavirus, la cual contiene dos géneros de virus oncogénicos a DNA: Papilomavirus y Polioma virus. El nombre de la familia deriva de sus primeros tres miembros (Papilloma, Polyoma, y Simian Vacuolating Agent (SV40 - un miembro del genus Polioma virus). Es un virus de doble cadena que codifica 8 genes³. L1 y L2 codifican las proteínas estructurales que forman la cápside y E6 y E7 codifican oncoproteínas que actúan interfiriendo la actividad normal de los genes p53 (impidiendo la apoptosis) y pRB (deteniendo el ciclo celular), respectivamente. (Figura 1). La expresión combinada de estas proteínas facilita la inestabilidad genómica y cromosómica. El último paso en la carcinogénesis es la integración del ADN vírico en el genoma celular. Existe una gran cantidad de diferentes genotipos del VPH, hasta la fecha se han identificado más de 180. Los más importantes son aquellos identificados con los

números 16 y 18, debido a su reconocido potencial oncogénico, mientras que los genotipos identificados como 6 y 11 y que poseen un bajo riesgo oncogénico, son los responsables de las verrugas anogenitales, tanto en mujeres como en hombres^{3, 6}.

Otros genotipos están relacionados con la aparición de verrugas en otros sitios anatómicos, tales como la planta y palma de pies y manos, dorso de las manos, cara y mucosas.

A pesar de que las VGE son una de las ITS más frecuentes^{7, 8} su epidemiología no está bien caracterizada. En la población general la incidencia anual de cualquier VGE (incluyendo nuevas y recurrentes) varía desde 160 en España⁹ a 289 en el Reino Unido por 100.000 habitantes, con una media de 194,5 por 100.000 habitantes¹⁰.

La distribución regional de nuevos casos de VGE por 100.000 habitantes es la siguiente: 101 a 205 en Norteamérica^{9, 10}, 118 a 170 en Europa¹¹ y 204 en Asia¹¹. En relación a la prevalencia, el rango se sitúa entre 0,13% y 0,16% en estudios utilizando la población general femenina como denominador^{6, 12}. Los datos epidemiológicos confirman que el pico de incidencia en hombres y mujeres jóvenes corresponde al pico de edad de adquisición de nuevas parejas sexuales¹³, sin embargo, algunos porcentajes de incidencia deben ser interpretados con cautela debido a variaciones en la metodología en cuanto a rangos de edad de las poblaciones. Wellings y cols.¹³, reportaron una incidencia de 149 por 100.000 habitantes en mujeres con edades comprendidas entre 14 a 65 años de edad comparados con 99 por 100.000 habitantes para la población general femenina¹⁴.

En Venezuela, Ávila y cols.¹⁵, analizaron 90 muestras de

¹ Especialista en primer Grado en Medicina General Integral y Dermatología. Diplomado en Hematodermias. Profesor Asistente. Investigador Agregado. Instituto Ecuatoriano de Seguro Social. Hospital Ibarra. Imbabura. Ecuador.

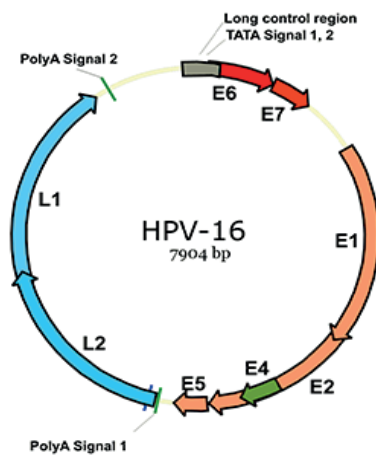


Figura 1. Diagrama del genoma del HPV. E: genes tempranos (early), L: genes tardíos (late). URR: región regulatoria. De Xmort - en:wiki, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=9065463>

lesiones del área genital de 40 hombres y 50 mujeres, sugestivas de infección por el VPH. El análisis histopatológico de las biopsias mostró, que, de los 90 pacientes, 72 (80%) correspondieron a condilomas acuminados, 29 en hombres y 43 en mujeres. El resto de las muestras analizadas (20%) presentaron otras patologías, sin embargo, ellos no aportan datos epidemiológicos de Venezuela en este estudio^{16,17}.

En los EEUU cada año son diagnosticados entre 500 000 y 1 millón de nuevos casos clínicos de condilomas, lo cual representa el 1 % de la población sexualmente activa⁸. En el 2015 alrededor de 80 000 nuevos casos de verrugas ano genitales fueron diagnosticados en las clínicas de medicina genitourinaria en el Reino Unido⁹.

En Cuba se aprecia un incremento en el año 2000 con un discreto descenso en el 2010, estudios recientes arrojan datos de incidencia del PHV del 3,2 % y otros de hasta el 8 %¹⁰. Durante la gestación aumenta la incidencia con una variación entre 11,6 % a 51,7 % según diferentes autores, quizás por el aumento del diagnóstico de la entidad efectuado durante los controles habituales de la etapa prenatal¹¹.

Todos los estudios revisados hacen el comentario que se podría estar ante la presencia de un sub-registro, tomando en cuenta que los datos disponibles son limitados debido a que la VGE, a diferencia de otras ITS, no tienen un obligatorio reporte a las autoridades sanitarias^{15,18}.

Los papilomas pueden ser subdivididos en tres categorías: bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo en base a la relación con el origen de las displasias intra epiteliales¹¹ y guardan además relación con el cáncer en otras localizaciones del organismo sobre todo oro faríngeo y ano genital (vulva, vagina, ano y pene)¹⁹.

El HPV tipo 6 y 11 raramente se vincula al cáncer cervical por lo que se consideran de bajo riesgo. La infección por este genotipo es responsable del 90 % de los casos con verrugas genitales¹¹.

En contraste los serotipos 16 y 18 están fuertemente asociados a la displasia cervical y por lo tanto son considerados de alto riesgo (oncogénicos). Se ha evidenciado la presencia de este genotipo en el 70 % de los carcinomas escamosos del cuello uterino¹¹.

Los serotipos 31, 33, 45, 51, 52, 56, 58, y 59 han sido considerados de riesgo intermedio pues, aunque se encuentran asociados a las neoplasias de tipo escamoso raramente

se vinculan al carcinoma epidermoide de cuello uterino¹¹. Las pacientes con condiloma acuminado pueden ser infectadas simultáneamente por múltiples serotipos de VPH, por lo que la aparición de verrugas ano genitales en la mujer embarazada, pueden ser para el ginecobstetra un signo de alerta en la búsqueda activa de los serotipos de alto riesgo una vez terminado el período puerperal y considerar a estas pacientes dentro del grupo de riesgo a padecer cáncer cervicouterino es prudente; por lo que la vigilancia en las mismas debería incrementarse al concluir este período. Las apariciones de los condilomas acuminados durante el embarazo pueden ser comparados con la punta del iceberg en la infección por VPH^{19, 20}.

Según la International Council on The Taxonomy of Viruses clasifica los genotipos 6 y 11 dentro del género Alfa-Papillomavirus y están implicados además en la producción de los condilomas acuminados y papilomas del cuello uterino y de la laringe²⁰.

En Ecuador, en donde según datos del año 2015 del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) cada año se presentan alrededor de 1200 nuevos casos del Virus del Papiloma Humano y 300 muertes por cáncer cérvico uterino siendo el décimo país con mayor incidencia en Latinoamérica²¹.

Según el Ministerio de Salud Pública (MSP) sobre la prevalencia y genotificación de VPH siendo del 6,3%, se han realizado estudios aislados en la ciudad de Quito y en Cuenca; en los cuales se determinó por histopatología una prevalencia de un 78.26% y mediante colposcopia e histopatología se determinó una incidencia del 85.1% y en la ciudad de Cuenca fue del 55.7 % .En Ibarra la incidencia se ha incrementado en los últimos 5 años, sin embargo no se cuantifica con claridad el total de casos por el subregistro existente²¹.

Desarrollo

Entre los factores de riesgo de las verrugas genitales se incluyen las parejas sexuales múltiples, la frecuencia de las relaciones sexuales, parejas de desconocidos, mal uso del preservativo, infección por otras ITS, el tener un compañero sexual con verrugas genitales externas, a su vez, el número de verrugas genitales externas del compañero sexual, el inicio temprano de la actividad sexual y el país de origen, porque se considera que en los países más pobres la prevalencia es mayor. En niños, aunque el virus puede transmitirse no sexualmente, la presencia de condiloma acuminado debería despertar sospechas de abuso sexual²².

Manifestaciones clínicas

Como el nombre sugiere, estas verrugas afectan a los tejidos húmedos de la zona genital. Las verrugas son generalmente de color carne gris y pueden ser elevadas o planas. Varían en tamaño desde muy pequeño (Figura 2) hasta las agrupaciones grandes que se detectan a simple vista, con aspecto de coliflor. (Figura 3)

En las mujeres, las verrugas genitales pueden crecer en la vulva, las paredes de la vagina, el área entre los genitales externos y el ano, y el cuello del útero. En los hombres, pueden ocurrir en la punta o el tallo del pene, el escroto o el ano. Las verrugas genitales también pueden desarrollarse en la boca o garganta de una persona que haya tenido contacto sexual oral con una persona infectada.

Los signos y síntomas de las verrugas genitales son: pequeñas protuberancias de color carne o gris en el área genital, varias verrugas juntas que toman en forma de coliflor, picazón o molestias en el área genital, sangrado durante las relaciones

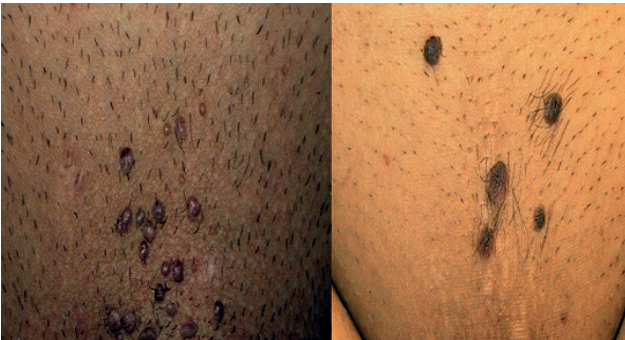


Figura 2. Presentación clásica del condiloma acuminado. A la izquierda en la zona púbica en el hombre y a la derecha en la mujer.

sexuales. A menudo, las verrugas genitales pueden ser tan pequeñas y planas, que no pueden ser vistas con el ojo. A veces, sin embargo, las verrugas genitales pueden multiplicarse en grandes grupos^{17, 19, 22}.

El diagnóstico de la VGE es logrado principalmente por la inspección visual. Una biopsia es necesaria solo en los siguientes casos: paciente inmunocomprometido, diagnóstico incierto, crecimiento repentino de la lesión o lesiones, y lesiones pigmentadas, induradas, ulceradas o sangrantes. La prueba del ácido acético tiene valor predictivo positivo bajo, y las nuevas guías del Centers for Disease Control and Prevention (CDC) no recomiendan este test para el diagnóstico²³.

El VPH es transmitido a través del contacto genital, usualmente durante el coito genital y/o anal, pero también puede ser transmitido a través del sexo oral. Muchas, sino la mayoría de las personas infectadas desconocen esta condición, y de esa manera, la infección puede ser transmitida a la pareja sexual. Una complicación adicional a esta infección es el largo periodo de incubación desde que ocurre la infección hasta que aparecen los síntomas, lo cual puede estar en el rango de 2 semanas a 8 meses²⁴.

El impacto psicosocial de la VGE es considerable. Puede incluir rabia, depresión y vergüenza. Muchas pacientes sienten miedo de ser estigmatizadas al ser esta una ITS, y esto frecuentemente tiene un impacto negativo en su relación de pareja y disfrute de la actividad sexual. Puede haber dispareunia y miedo de transmitir la enfermedad a la pareja, así como también miedo de la posibilidad de que la infección por VPH progrese a cáncer²⁵.

Diagnóstico diferencial

Además de diferentes patologías como condilomas planos de la sífilis y fibroepiteliomas, el principal diagnóstico diferencial en hombres son las pápulas perladas peneanas, una condición fisiológica que se observa en adolescentes y consiste en hileras de pápulas no coalescentes de 1 a 2 mm de diámetro, que aparecen alrededor del glande. La superficie es lisa y no presentan el patrón vascular de las VGE. En las mujeres deben diferenciarse también de micropapilomatosis labialis, otra condición fisiológica que se caracteriza por sobrelevaciones no coalescentes en la superficie interna de los labios menores y vestíbulo. Las glándulas sebáceas del prepucio y vulva pueden verse en individuos normales como lesiones múltiples, de color gris amarillento en la cara interna del prepucio y labios menores^{25, 26}.



Figura 3. La imagen muestra verdaderos tumores en coliflor por VPH..

Terapéutica

Los tratamientos disponibles para el tratamiento se clasifican por: el mecanismo de acción del fármaco, médico o quirúrgico, y tipo de centro médico donde se aplicará la terapia^{23,25}.

La selección del plan de tratamiento inicial para cualquier individuo depende de diversas variables. Es importante considerar para la elección del tratamiento de las VGE la morfología, el número de lesiones y la localización anatómica. Las verrugas en superficies húmedas o áreas intertriginosas es más probable que respondan al tratamiento local. Aquellas que son pediculadas son fáciles de extirpar con una simple escisión en la interfase de la verruga y la piel sana. Verrugas múltiples y muy queratinizadas requieren con frecuencia terapia ablativa.

En relación a la paciente el tratamiento dependerá de variables tales como su habilidad para adherirse exitosamente el tratamiento, bien sea aplicándolo en el hogar o regresando a visitas adicionales con el médico tratante, el impacto de los potenciales efectos colaterales, costo en tiempo y dinero, cobertura por las compañías de seguros (algunas compañías aseguradoras asumen la infección por VPH como una enfermedad preexistente y no cubren su tratamiento). En relación al médico debemos considerar los equipos que posee, y la experiencia que tiene en la administración del tratamiento²⁵.

La flexibilidad también es una condición necesaria en el tratamiento de una paciente quien tiene VGE. Si la terapia inicial es inefectiva o si la paciente experimenta efectos colaterales significativos, la modalidad de tratamiento deberá ser modificada^{25, 26}.

Terapias aplicadas por el médico

Podofilina (10-25%). Es un agente antimitótico que destruye las verrugas induciendo su necrosis. Es uno de los tratamientos contra VGE más antiguos que se conocen. Esta puede ser aplicada a verrugas únicas, pero no reduce el riesgo de absorción sistémica lo cual puede conllevar a una serie de efectos adversos que incluyen supresión de médula ósea, disfunción hepatocelular, compromiso neurológico, alucinaciones, dolor abdominal agudo, por estas razones algunos autores han recomendado el abandono de su práctica²⁷.

Ácido tricloroacético (80-90%). Es recomendado para el tratamiento de las verrugas vaginales y anales. Este agente destruye la verruga por coagulación de sus proteínas a través de una inducción química. El tratamiento no es específico por lo cual puede producir daño a todo tejido que este en contacto. Deberá ser usada una técnica cuidadosa de aplicación debido a que esta solución es de viscosidad más baja comparada con

el agua y por lo tanto se esparce rápidamente. Una solución a este problema es crear una barrera con gel de petrolato o ungüento de lidocaína con el fin de evitar que el líquido se esparza a zonas de tejido sano. Una técnica es utilizar un aplicador con punta de algodón, mojarla con la solución y aplicar el agente a la verruga tratando de evitar el tejido sano circundante. Debe asegurarse que toda la solución se haya secado completamente antes de que la paciente se vista. Debido a que la sensación de ardor es más intensa durante el secado, se puede utilizar un secador de cabello para acelerar este proceso, siempre y cuando la paciente este de acuerdo con este enfoque. Por último, si algo de la solución se derrama en otros tejidos, esta puede ser neutralizada con jabón o bicarbonato de sodio. El exceso de material aplicado a la verruga puede ser absorbido con talco, bicarbonato de sodio o jabón líquido²⁸.

Terapia quirúrgica. Las verrugas perianales cuyo pedúnculo es delgado pueden ser extirpadas a través de una incisión tangencial bien sea con tijera o bisturí, separando la base de la verruga de la capa superior de la dermis de la piel. Esta es una técnica segura y efectiva²⁹. La hemostasia es fácilmente lograda con presión, nitrato de plata o solución de Monsel (subsulfato férrico).

Alternativamente se puede utilizar láser de CO₂ o electrocauterio (asa de LEEP) para disecar la verruga. Tales tratamientos obviamente requieren de equipo especial y entrenamiento especializado lo cual incrementa su costo. Después que el anestésico local es aplicado, la verruga puede ser desuñida con electrocauterio, pero se debe prestar atención para limitar la profundidad de la destrucción para evitar cicatrices y futuros problemas como vulvodinia o síndromes de hiperestesia²⁹.

La ablación quirúrgica con láser de CO₂ es también altamente efectiva pero generalmente se reserva para lesiones extensas y aquellas que han demostrado ser resistentes a otras terapias. En tales casos, el procedimiento es realizado en un quirófano bajo anestesia regional. Es importante realizar este procedimiento utilizando un aspirador de humo adecuado debido a la potencial liberación de partículas de VPH³⁰.

La crioterapia es una técnica que destruye la verruga por congelamiento del agua dentro de la mitocondria. La crioterapia con nitrógeno líquido es recomendada para las verrugas vaginales, verrugas localizadas en el meato uretral y verrugas anales²⁹.

Con esta terapia de citólisis inducida, la licuefacción y destrucción de la verruga puede tomar días o semanas. La aplicación cuidadosa del nitrógeno líquido o una apropiada selección de criosondas es importante para evitar la destrucción del tejido sano que rodea a la verruga. Es común la aparición de dolor después de la aplicación y puede ser reducido con la aplicación de un anestésico tópico local antes de congelar la verruga. La anestesia inyectada puede ser útil para lesiones grandes y/o extensas. El tratamiento puede ser repetido cada 1 a 2 semanas, dependiendo de la respuesta individual al tratamiento. El permitir un tiempo adecuado entre cada aplicación de la terapia ayuda a prevenir las cicatrices hipertróficas de la zona tratada. Para lesiones externas el tratar solo una porción de las lesiones a la vez puede reducir la severidad de los efectos colaterales^{29, 30}.

Terapias aplicadas por el paciente

Podofilox. Al igual que la Podofilina, Podofilox (CondylloxTM) es una droga antimitótica que destruye a las verrugas induciendo su necrosis. Está disponible como solución que se aplica con los dedos o con un Q-tips. Las aplicaciones se

realizan dos veces al día por tres días consecutivos seguido por cuatro días sin tratamiento por un total de cuatro ciclos. Aplican las mismas restricciones a la terapia con Podofilina tal como no usarla en un volumen que exceda los 0,5 ml/por día y limitando el área a tratar a 10 cm². El área deberá ser lavada seis a ocho horas después del tratamiento. Puede desarrollarse dolor local moderado o ulceración local. Su seguridad durante el embarazo no ha sido comprobada y por lo tanto se aconseja el uso de un método anticonceptivo efectivo^{30, 31}.

Imiquimod (5%). Es un inmunomodulador que estimula la producción local de citoquinas que destruyen las células infectadas por el VPH. La droga se aplica a las verrugas una vez al día antes de acostarse en días alternos para un total de tres dosis en un periodo de siete días. El régimen puede ser repetido hasta que las lesiones sean eliminadas, pero por no más de 16 semanas. El área tratada deberá ser lavada con agua y jabón después de 6 a 10 horas después de la aplicación del medicamento. Debido a que Imiquimod está mezclado en un vehículo basado en petrolato, se deberán evitar los condones de látex y los diafragmas vaginales durante su uso. Las parejas deberán esperar hasta que el ungüento sea lavado o deberán usar condones fabricados con polysopreno o poliuretano³¹.

Nuevos tratamientos

Imiquimod (3,75%). En el año 2010, la Food and Drug Administration (FDA) aprobó el uso de Imiquimod al 3,75% en crema para el tratamiento de las VGE^{31, 32}. Imiquimod al 3,75% está indicado para el tratamiento de las VGE y perianales en pacientes mayores de 12 años. Estudios de Fase II, doble ciego y estudios controlados con placebo han demostrado que Imiquimod al 3,75% es significativamente más efectivo que el placebo. Adicional a esto, los porcentajes de recurrencia fueron relativamente bajos con un porcentaje de curación de los pacientes de más del 85%, en un protocolo de 12 semanas de seguimiento³³. Imiquimod al 3,75% deberá ser aplicado a las verrugas durante 8 horas y su frecuencia de administración es una vez al día por dos semanas y se repetirá este ciclo después de dos semanas de descanso. Los porcentajes de curación del Imiquimod al 3,75% no son tan altos como los de Imiquimod al 5%. Sin embargo, este nuevo producto tiene algunas ventajas sobre la presentación al 5% con respecto al cumplimiento del tratamiento por parte de la paciente. El tratamiento con Imiquimod al 3,75% es significativamente menos prolongado, con una aplicación diaria para un máximo de 8 semanas de tratamiento³⁴ versus 16 semanas de tratamiento en días alternos para el Imiquimod al 5%³⁵. Adicionalmente, la crema al 3,75% tiene menos efectos colaterales que el Imiquimod al 5%. Las principales quejas incluyen prurito, sensación de ardor o dolor en la zona de aplicación³⁶. A diferencia de la crema al 5%, no se han asociado síntomas sistémicos asociados al uso del Imiquimod al 3,75%, sin embargo, esta presentación es más costosa que su equivalente al 5%.

Sinecatequinas (Polifenon E). Es un extracto estandarizado de las hojas del té verde (*Camellia sinensis*). La epigalocatequina galato es la catequina más importante e interviene en múltiples vías de señalización celulares, activando la vía de las caspasas. La posología es de 3 aplicaciones diarias durante un máximo de 16 semanas. Estudios aleatorizados y controlados realizados con pacientes de ambos sexos han mostrado tasas generales de regresión de las lesiones entre el 54-65%, mientras que los pacientes de los grupos placebo obtenían tasas medias del 35%^{37, 38}.

El efecto del fármaco se empieza a observar clínicamente aproximadamente a partir de la tercera semana de tratamien-

to, y es más evidente a partir de la cuarta o sexta semana³⁷. Los signos y/o síntomas locales son los efectos indeseados más frecuentes (80%), sobre todo el eritema y el prurito, y se manifiestan a partir de la segunda o tercera semana de tratamiento^{37, 38}. Pese al alto porcentaje de reacciones, estas son bien toleradas. La reacción inflamatoria, indicativa de la actividad del fármaco, traduce una activación inmunológica local mediada por citocinas proinflamatorias. Se ha observado que los individuos que responden tienen una incidencia superior de reacciones cutáneas locales en comparación con aquellos que no responden al tratamiento³⁹.

En definitiva, parece un tratamiento efectivo, seguro y bien tolerado, ya que son pocos los pacientes que suspenden el tratamiento debido a los efectos indeseados del preparado. Como contrapartida, es un tratamiento largo que puede prolongarse hasta las 16 semanas y que debe aplicarse 3 veces al día, lo cual puede afectar al cumplimiento del mismo. La mayoría de los estudios aleatorios y controlados excluyen a pacientes con infección por el VIH y trasplantados, hecho que limita los resultados a individuos inmunocompetentes. Tampoco existen datos sobre efectividad en las verrugas internas.

Terapia fotodinámica. La terapia fotodinámica (TFD) con ácido 5-aminolevulínico (AAL) es una técnica relativamente reciente para el tratamiento de las VGE^{40, 41}. Se basa en la respuesta inmunitaria que se produce tras la destrucción tisular inducida por una reacción fototóxica. Se ha observado que el ácido 5-aminolevulínico (ALA) se acumula en mayor cantidad en las células infectadas por el VPH que en la piel normal adyacente⁴². Se ha propuesto como una opción para aquellas lesiones rebeldes al tratamiento, o en aquellos casos en los que existen recurrencias pese a haberse realizado un tratamiento correcto. También se ha utilizado en el tratamiento de la Neoplasia Intraepitelial Cervical y vulvar⁴².

Se ha demostrado que la TFD sola es más efectiva comparado con el uso de laser de CO2 convencional, siendo la TFD más segura, más efectiva y con porcentajes más bajos de recurrencia⁴³. Los efectos secundarios son locales y se presentan en forma de dolor, ardor y eritema³⁵. Parece que el efecto terapéutico de la TFD en los condilomas vendría dado por una rápida activación de las células dendríticas y de los linfocitos CD4 en la piel lesionada⁴⁴. La terapia fotodinámica no es una cura para todos los casos, puede ser una terapia adicional a otras terapias destructivas para el tratamiento de la VGE³¹.

Vacunas profilácticas que actuarían como tratamiento

Actualmente existen en el mercado dos vacunas profilácticas contra el VPH, una es tetravalente (contra los genotipos 16, 18, 6 y 11) y la otra es bivalente (genotipos 16 y 18). Estas vacunas se basan en la administración de partículas parecidas al virus (VLP's, por sus siglas en inglés) pero sin material genético en su interior, constituidas por la fracción L1 o proteína estructural del virus obtenida a través de recombinación genética. Con esto se logra mimetizar a un verdadero virus, induciendo una respuesta inmune humoral, pero sin sus efectos patológicos⁴⁵.

Desde que estas vacunas fueron aprobadas para su uso como profilaxis de la infección por VPH en el año 2006 se han reportado casos de remisión de verrugas que habían sido resistentes a diferentes tratamientos^{46, 47}. Hasta la fecha no se conoce el mecanismo exacto por el cual la vacuna profiláctica pudiese provocar esta respuesta o si tal vez se trata de una relación casual por regresión espontánea de las lesiones. Podrían estar implicadas algunas citocinas locales, con inducción de células productoras de interferón o linfocitos CD8 citotóxi-

cos, pero también es posible que los constituyentes no-VPH de la vacuna profiláctica desempeñen algún papel en la desaparición de estas lesiones⁴⁷.

Vacunas terapéuticas

Desde hace algunos años se viene explorando la posibilidad de usar tratamientos con vacunas dirigidas contra las oncoproteínas E6/E7 de los VPH oncogénicos¹⁶, pero estarían dirigidas a las lesiones precancerosas y cancerosas provocadas por estos virus oncogénicos, de tal forma que aún faltan estudios que demuestren su efecto sobre las verrugas. Aun no hay suficientes estudios clínicos bien diseñados y con suficientes pacientes que puedan avalar estas observaciones^{46, 47}.

El α -IFN. Con su efecto antifibrótico viene a enmendar en no pocas situaciones las consecuencias de la fibrosis provocada por aplicaciones de cáusticos y tratamientos destructivos locales. Su acción antiviral e inmunomoduladora permite además intervenir en la génesis del proceso en cuestión o que se evidencia en los resultados de ensayos clínicos⁴⁸.

En la década del 90 del pasado siglo se publicaron resultados convincentes de la eficacia del IFN- α 2b Hr en el tratamiento de la condilomatosis genital, estudios recientes también avalan su uso⁴⁸, sin embargo, algunas guías de tratamiento actuales no lo recomiendan como tratamiento de primera línea sino cuando fallan tratamientos previos, alegándose limitados resultados de eficacia, eventos adversos severos y limitaciones económicas^{48, 49}.

Se hace necesario evidenciar también nuestros resultados de eficacia y seguridad en el uso clínico cotidiano del IFN- α 2b Hr cubano (Heberon Alfa R[®]). Este producto registrado en Cuba por la autoridad reguladora nacional de medicamentos, el Centro de control estatal de medicamentos (CECMED), ha sido estudiado en ensayo clínico de bioequivalencia con el Viraferon[®] de la Schering-Plough, irlandesa) con resultados de seguridad, farmacocinética y farmacodinamia similares para ambas formulaciones⁵⁰.

Contraindicaciones o precauciones a tener en cuenta para su uso:

- enfermedad del corazón, fallo cardiaco congestivo, angina (dolor de pecho);
- enfermedad severa del pulmón como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC, COPD, por sus siglas en inglés);
- diabetes;
- depresión de la médula ósea;
- un trastorno de convulsiones; o
- una enfermedad de sangramiento o de la coagulación, como hemofilia.

Otra variante que se ha usado con poder antiviral lo constituye el Interferón alfa-n3. Este por lo general se administra 2 veces por semana por un espacio que puede extenderse hasta 8 semanas. Los efectos secundarios más frecuentes son fiebre, escalofríos, mialgia, dolor de cabeza, fatiga y leucopenia, aunque puede mantenerse su uso bajo vigilancia médica⁵¹. El interferón puede administrarse, ya sea de forma sistémica o intralesional, mostrando mayor efectividad cuando se inyecta directamente en las lesiones. Las tasas de recurrencia son comparables con otras modalidades de tratamiento⁵².

Conclusiones y recomendaciones

La infección por el VPH es una de la ITS con mayor prevalencia aun a pesar de no conocerse con exactitud debido al sub-registro epidemiológico existente. A través del tiempo se

han desarrollado una diversidad de tratamientos que van desde el quirúrgico hasta terapias más recientes como los inmunomoduladores y la terapia fotodinámica. Hemos recorrido un largo camino en busca de un tratamiento altamente efectivo para tratar esta patología, pero aún queda mucho camino por recorrer y evidentemente la solución está enfocada en tratamientos de tipo inmunológico que logre frenar el desarrollo de estas lesiones y su cura permanente.

Recomendaciones y educación

La educación y consejería son aspectos importantes en el manejo de pacientes con VGE. Debe intentarse cubrir los siguientes mensajes claves: a) la infección genital por HPV es una infección viral común en individuos adultos sexualmente; b) se transmite vía sexual, pero los períodos de incubación son variables y es generalmente difícil determinar la fuente de infección; c) la evolución es generalmente benigna y es común la recidiva dentro de los primeros meses luego del tratamiento; d) la posibilidad de transmisión a futuras parejas y la duración de la infectividad luego del tratamiento son desconocidas. El uso de preservativos de látex y el diálogo informativo sobre otras ITS deben ser estimulados e intentados en lo posible. La información es fundamental para el manejo adecuado de los pacientes y debe contener juicios valorativos, ofreciendo apoyo y enfocándose en la naturaleza de la enfermedad, las expectativas sobre la terapéutica y una perspectiva equilibrada sobre temas que impliquen la sexualidad.

Referencias bibliográficas

- Gallardo J, Valdés S, Díaz ME y cols. Comportamiento de las enfermedades de transmisión sexual en pacientes con sepsis ginecológica. *Rev Cubana ObstetGinecol.* 2014; vol 26(1).
- Abreu A, Lovio Z. Enfermedades de transmisión sexual. Cap 15. En: *Dermatología.* [disponible en <http://bvs.sld.cu/libros-texto>].
- Oviedo G, Arpaia AL, Ratia E, y cols. Factores de riesgo en mujeres con infección del virus papiloma humano *revchilobstetginecol.* 2014; 69(5): 343-346.
- Reyes M, Sánchez L, del Puerto C. Determinantes del Estado de Salud. Cap. 14. En: *Fundamentos de Salud Pública.* ECIMED. Ciudad de la Habana. 2015.
- Hsueh PR. Human papillomavirus, genital warts, and vaccines. *J Microbiol Immunol Infect* 2012; 42:101-6.
- Grm HS, Bergant M, Banks L. Human papillomavirus infection, cancer & therapy. *Indian J Med Res* 2013; 130:277-85.
- Stanley MA. Genital human papillomavirus infections: Current and prospective therapies. *J Gen Virol* 2012; 93:681-91.
- Muñoz N, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Pérez G, Brown DR, Koutsky LA, Tay EH, García PJ, Ault KA, Garland SM, Leodolter S, Olsson SE, Tang GW, Ferris DG, Paavonen J, Steben M, Bosch FX, Dillner J, Huh WK, Joura EA, Kurman RJ, Majewski S, Myers ER, Villa LL, Taddeo FJ, Roberts C, Tadesse A. Impact of human papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 Vaccine on all HPV associated genital diseases in young women. *J Natl Cancer Inst* 2013; 102:325-39.
- Johnston A, Fernando D, MacBride-Stewart G. Sexually transmitted infections in New Zealand in 2003. *N Z Med J* 2015; 118:U1347.
- Cuba. Ministerio de Salud Pública. Sistema de Información Estadístico Complementario. La Habana: Minsap; 2016.
- Desai S, Wetten S, Woodhall SC, Peters L, Hughes G, Soldan K. Genital warts and cost of care in England. *Sex Transm Infect* 2016; 87:464-8.
- Patel H, Wagner M, Singhal P, Smita K. Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts. *BMC Infectious Diseases* 2013; 13:39.
- Wellings K, Collumbien M, Slaymaker E, Singh S, Hodges Z, Patel D, Bajos N. Sexual behaviour in context: a global perspective. *Lancet* 2016; 368:1706-28.
- Hillemanns P, Breugelmanns JG, Giesecking F, Benard S, Lamure E, Littlewood K, Petry KU. Estimation of the incidence of genital warts and the cost of illness in Germany: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2010; 8:76.
- Ávila M, Cavazza ME, Vásquez W, Ortega J, López Y, Correnti M. Genotipificación del virus de papiloma humano en pacientes con condilomas acuminados. *Rev Soc Venezolana Microbiol* 2010; 28:127-33.
- Wick DA, Web JR. A novel, broad spectrum therapeutic HPV vaccine targeting the E7 proteins of HVP16, 18, 31, 45 and 52 that elicits potent E7-specific CD8 T cell immunity and regression of large, established, E7-expressing TC-1 tumors. *Vaccine* 2011; 29:7857-66.
- Muñoz-Santos C, Pigem R, Alsina M. New treatments for human papillomavirus infection. *Actas Dermosifiliogr* 2013; 104:883-9.
- CDC. Genital HPV Infection. Hoja de datos. Disponible en: www.cdc.gov/std/HPV/STDFact-HPV.htm#common. Acceso el 18 de marzo de 2011.
- Dunne EF, Park IU. HPV and HPV-Associated Diseases. *Infect Dis Clin North Am* 2013; 27:765-78.
- Hans-Ulrich Bernard. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2015;(32S):S1-S6.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos 2015.
- Anderson LA. Prophylactic human papillomavirus vaccines: Past, present and future. *Pathology* 2012; 44:1-6.
- Workowski KA, Berman S; Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2014; 59(RR-12):1-110.
- Anic GM, Giuliano AR. Genital HPV infection and related lesions in men. *Prev Med* 2014; 53 Suppl 1:S36-41.
- Daley EM, Perrin KM, McDermott RJ, Vamos CA, Ra-yko HL, Packing-Ebuen JL, Webb C, McFarlane M. The psychosocial burden of HPV: a mixed-method study of knowledge, attitudes and behaviors among HPV+ women. *J Health Psychol* 2015; 15:279-90.
- Stockfleth E, Meyer T. The use of sinecatechins (polyphenon E) ointment for treatment of external genital warts. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12:783-93.
- Von Krogh G, Longstaff E. Podophyllin office therapy against condyloma should be abandoned. *Sex Transm Infect* 2011; 77:409-12.
- Scheinfeld JD, Lehman DS. An evidence-based review of medical and surgical treatments of genital warts. *Dermatol Online J* 2016; 12(3):5.
- Kodner CM, Nasraty S. Management of genital warts. *Am Fam Physician* 2014; 70:2335-42.
- French L, Nashelsky J, White D. What is the most effective treatment for external genital warts? *J Fam Pract* 2012; 51:312-4.
- Scheinfeld N. Update on the treatment of genital warts. *Dermatol Online J* 2013;19(6):18559.
- Berman B, Wolf J. The role of Imiquimod 3.75% cream in the treatment of external genital warts. *Skin Therapy Lett* 2014; 17:5-7.
- Baker DA, Ferris DG, Martens MG, Fife KH, Tying SK, Edwards L, Nelson A, Ault K, Trofatter KF, Liu T, Levy S, Wu J. Imiquimod 3.75% cream applied daily to treat anogenital warts: combined results from women in two randomized, placebo-controlled studies. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2016; 52:828-36.
- Zyclara® cream, 3.75% [información del laboratorio fabricante]. Graceway Pharmaceuticals, LLC. Bristol, TN, 2011.
- Edwards L, Ferenczy A, Eron L. Self-administered topical 5% Imiquimod cream for external anogenital warts. HPV Study Group. *Human Papilloma Virus. Arch Dermatol* 1998; 134:25-30.
- Yanofsky VR, Patel RV, Goldenberg G. Genital warts: a comprehensive review. *J Clin Aesthet Dermatol* 2015; 5:25-36.
- Tzellos TG, Sardeli C, Lallas A, Papazisis G, Chourdakis M, Kouvelas D. Efficacy, safety and tolerability of green tea catechins in the treatment of external anogenital warts: A systematic review and meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25:345-53.

38. Tatti S, Swinehart JM, Thielert C, Tawfik H, Mescheder A, Beutner KR. Sincatechins a defined green tea extract in the treatment of external anogenital warts: A randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2015; 111:1371-9.
39. Gross G, Meyer KG, Pres H, Thielert C, Tawfik H, Mescheder A. A randomized, double-blind, four-arm parallel-group, placebo controlled phase II/III study to investigate the clinical efficacy of two galenic formulations of polyphenon E in the treatment of external genital warts. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2017; 21:1404-12.
40. Kreuter A, Wieland U. Lack of efficacy in treating condyloma acuminata and preventing recurrences with the recombinant quadrivalent human papillomavirus vaccine in a case of series of immunocompetents. *J Am Acad Dermatol* 2013; 68:179-80.
41. Liu YX, Zheng HY, Liu XR. 5-aminolevulinic acid-photodynamic therapy for the treatment of cervical condylomata acuminata. *Chin Med Sci* 2014; 24:151-5.
42. Lee Y, Baron ED. Photodynamic therapy: Current evidence and applications in dermatology. *Semin Cutan Med Surg* 2013; 30:199-209.
43. Nucci V, Torchia D, Cappugi P. Treatment of anogenital condylomata with topical photodynamic: report Of 14 cases and review. *Int J Infect Dis* 2015; 14 Suppl 3:e280-2.
44. Giomi B, Pagnini F, Cappuccini A, Bianchi B, Tiradritti L, Zuccati G. Immunological activity of photodynamic therapy for genital warts. *Br J Dermatol* 2015; 164:448-51.
45. Anderson LA. Prophylactic human papillomavirus vaccines: Past, present and future. *Pathology* 2012; 44:1-6.
46. Landis MN, Lookingbill DP, Sluzevich JC. Recalcitrant plantar warts treated with recombinant quadrivalent human papillomavirus vaccine. *J Am Acad Dermatol* 2012; 67:e73-4.
47. Kreuter A, Waterboer T, Wieland U. Regression of cutaneous warts in a patient with WILD syndrome following recombinant quadrivalent human papillomavirus vaccination. *Arch Dermatol* 2017; 146:1196-7
48. Mistrangelo M, Cornaglia S, Pizzio M, Rimonda R, Gavello G, Dal Conte I, Mussa A. Immunostimulation to reduce recurrence after surgery for anal condyloma acuminata: a prospective randomized controlled trial. *Colorectal Dis*; 2013.
49. Guías para el tratamiento de las infecciones de transmisión sexual. Ginebra, Suiza: Catalogación por la Biblioteca de la OMS; 2011.
50. García-García I, González-Delgado CA, Valenzuela-Silva C, Hernández-Bernal F, Ferrero-Bibilonia J, Soto-Hernández R, et al. Bioequivalence of Two Recombinant Interferon α -2b Liquid Formulations in Healthy Male Volunteers. *Drugs R D*. 2014; 5 (5):271-80.
51. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2012. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep*. 2012; 51: 1-80.
52. Alam M, Stiller M. Direct medical costs for surgical and medical treatment of condylomata acuminata. *Arch Dermatol* 2011; 137: 337-41.

Recibido: 22 agosto 2017

Aprobado: 25 diciembre 2017

NEWS AND VIEWS / NOTICIAS Y OPINIONES

A review of cellular reprogramming: limitations and recent advances. Revisión sobre la reprogramación celular: límites y avances recientes.

Doménica Encalada Barahona¹, Mateo Flores Naranjo², Camila Viera Herrera¹

DOI. 10.21931/RB/ 2018.03.02.12

Abstract: Cellular reprogramming has been around for many years offering opportunities in areas such as regenerative medicine. New technologies and methods have merged since its origin. However, no method has yet been totally successful. A wide range of possible applications, from healing small wounds to curing complex illnesses like Alzheimer, is the reason to continue the exhaustive research in this area. In this review paper, we make a compilation of the most relevant reprogramming technologies. We go over the initial techniques to the most recent advances, especially highlighting each of their benefits and limits. Finally, we make a comparison of the current reprogramming technologies in regenerative medicine and remark the importance of continuing the present investigations.

Keywords: reprogramming, transfection, nanotechnology, regenerative medicine, iPSCs.

Resumen: La reprogramación celular existe desde hace muchos años ofreciendo oportunidades en áreas como la medicina regenerativa. Nuevas tecnologías y métodos se han fusionado desde su origen. Sin embargo, ningún método ha sido totalmente exitoso hasta la actualidad. Una amplia gama de posibles aplicaciones, desde curar pequeñas heridas hasta enfermedades complejas como el Alzheimer, es la razón para continuar la investigación exhaustiva en esta área. En este documento de revisión, hacemos una compilación de las tecnologías de reprogramación más relevantes. Repasaremos desde las técnicas iniciales hasta los avances más recientes, destacando especialmente cada uno de sus beneficios y límites. Finalmente, hacemos una comparación de las tecnologías actuales de reprogramación en medicina regenerativa y destacamos la importancia de continuar las investigaciones actuales.

Palabras clave: reprogramación, transfección, nanotecnología, medicina regenerativa, iPSCs.

Introduction

Differentiation was frequently thought as a one-way traffic in which cells pass from an undifferentiated or progenitor state to a mature one, without the ability to switch function¹. However, since the discovery of stem cells (SC), scientists started to look for strategies that could allow them to mimic SCs' behavior and reverse that dogma. The technique that has allowed investigators to achieve that change is reprogramming, an event based on giving plasticity to terminally differentiated cells. This befalls through transfection, which is the introduction of foreign nucleic acids into cells to induce genetic modification². Somatic cells are transformed into induced pluripotent stem cells (iPSCs) which, in fact, shown to be functionally equivalent to stem cells³. Reprogramming somatic cells directly to iPSCs eliminates the necessity of using embryonic material and additionally contributes to the production of patient-specific cells of any type⁴.

Background

The first approach to iPSCs technology was somatic cell nuclear transfer (SCNT). The basis of this method consists in the incorporation of the nucleus of a somatic cell to an enucleated oocyte, generating cloning⁵. This demonstrated that even stable differentiated cells can be inverted to their original state because of the genetic information contained and that some factors present at oocytes can help reprogramming somatic cell nuclei⁶. Nuclear cloning generated doubt about the epigenetic mechanisms that were transforming somatic

to embryonic cells, giving the first clues that had to be solved for the explanation of cellular reprogramming⁷. However, nuclear cloning triggered insertional mutations and abnormal pattern of expression under study due to unsatisfactory reprogramming⁸.

Later, in 2001, Takashi Tada's group integrated the presence of reprogramming factors of somatic cells in embryonic stem cells such as integrating vectors, non-integrating vectors⁹. This generated another reprogramming technique based on the combination of somatic cells and embryonic stem cells⁵. Epigenetic reprogramming of somatic nuclei was accomplished and proved in murine hybrids. The development and results of some experiments were accurate but none gave full confidence⁷. With this two first approaches, researchers got convinced with the idea that a combination of factors is what drives reprogramming of somatic cells.

Cellular reprogramming research has now focused on overcoming obstacles, developing and improving new direct reprogramming techniques. Various methods are being implemented, each comprising better characteristics but based on the same principle of working. We consider the most important and recent are micro RNA, messenger RNA, and transcription factors (Figure 1).

Micro RNA (miRNA)

miRNAs are part of the trending factors that researchers have seen as influencers in converting somatic to embryonic cells. Micro RNA comprises approximately 22 nucleotides of non-coding RNA that commonly promotes the degradation or

¹ School of Biological Sciences and Engineering, Yachay Tech University, Urcuquí, Imbabura, Ecuador.

² School of Chemical Sciences and Engineering, Yachay Tech University, Urcuquí, Imbabura, Ecuador.

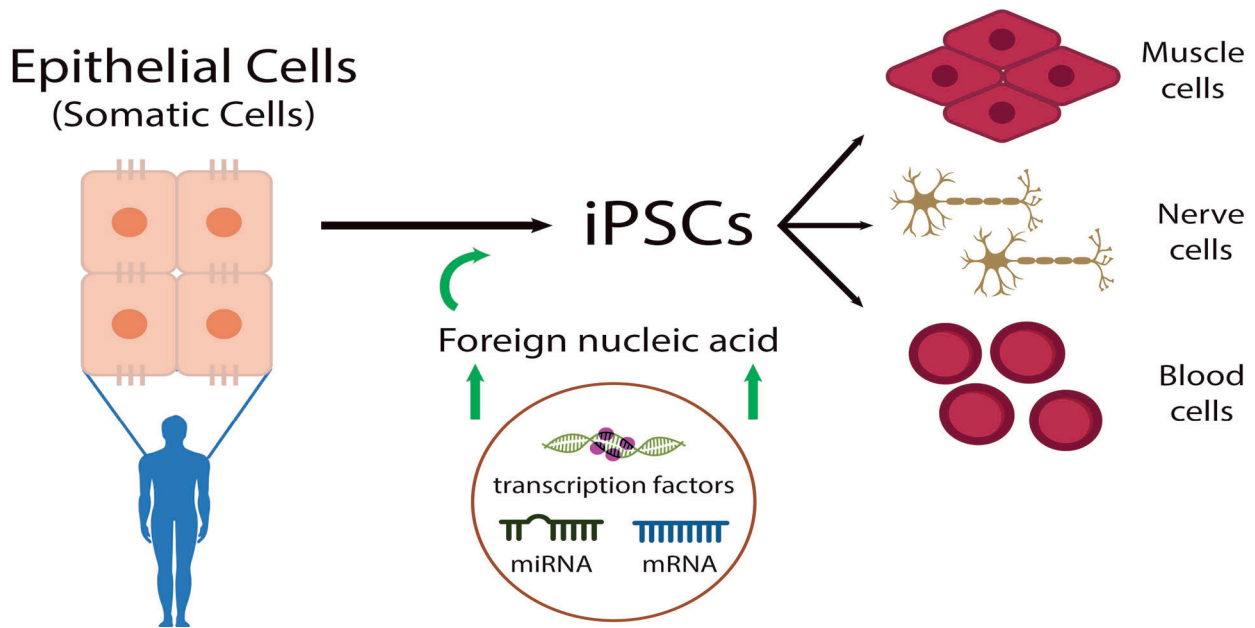


Figura 1. Principle of working of the most recent methods of cellular reprogramming. We show epithelial cells as example of starting point, which are then transformed to iPSCs by the insertion of any foreign nucleic acid (miRNA, mRNA or transcription factors). From there, we can obtain any type of somatic cell be it muscle, nerve, blood or other cell.

inhibit the translation of messenger RNA by binding within it. Essentially some clusters, specifically miR-209-295 and miR-302-367 seem to present some evidence of promoting cellular trans-differentiation and reprogramming into iPSCs and even replace some transcription factors. These processes were found to occur by inhibiting enzymes and signaling paths¹⁰. Similarly, some other studies have shown that miRNAs play a crucial role in the regulation of self-regeneration of stem cells and differentiation.

Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of miR-302-367 with embryonic stem cells (ESCs) tend to maintain "stemless" over differentiating leading a delay for early differentiating ESCs. miR-9 and miR-124 mediate cell trans-differentiation while inducing the conversion of fibroblasts into neurons through mesenchymal to epithelial transition (MET). And most essential, reprogramming somatic cells into iPSCs and human ESCs, uses these bundles of miRNA. Its tendency to undergo reversible MET sustains the expression of pluripotency among these cells by activating OCT4 gene expression cooperating with Hdac2 suppression showing some powerful pathways in reprogramming somatic cells into pluripotency^{11,12}.

Messenger RNA (mRNA)

An additional reprogramming tool that many groups of scientists have been using is mRNA, having various degrees of success¹³. Messenger RNA is a subtype of RNA that takes a portion of the DNA code to other parts of the cell for processing¹⁴. The mRNA-based reprogramming technology is a non-integrating, non-viral, highly clinically applied. Their potential is due to the reduction of the risk of integration and mutagenesis in the genome^{15,16}. One study shows the efficiency of repeated administration of synthetic messenger RNAs. The modifications made include the incorporation of additional factors to overcome innate antiviral responses. In addition, the mRNA reprogramming suggests a titratable dose of expression of different mRNAs, which provides stoichiometric control of essential factors during reprogramming¹⁶. This simple,

non-mutagenic, and controllable technology can be applied to directed differentiation of RNA-iPSCs (RiPSCs) to terminally differentiated myogenic cells¹⁷.

The application of mRNA gives advantages in comparison to orthodox drugs because mRNA does not use biological structures, avoiding biodegradation and environmental issues with a high efficacy and fast kinetics¹⁸. However, there are some limitations such as some transfections needed to induce iPSCs due to the short half-life of mRNAs^{15,18}. The most recent report in this field, non-modified mRNA, showed no toxicity and immune response in the generation of iPSCs¹³. The original paper details the principal steps that have to be followed to develop this method successfully¹³.

Transcription factors

Scientists have found that differentiated somatic cells can be directly transformed into embryonic stem cells by ectopic co-expression of specific transcription factors^{18,19}. This epigenetically resets somatic cells into an early development stage which then develop to other cell types³. Since this technique showed up, some transcription factors have been used; cells from different somatic lineages of a varied group of species. The potential that has been generated by forced expression in transcription factors is limited since the majority has not been able to support the development of animals completely derived from iPSC¹⁸.

Hence, scientists started to use new resources to develop new methods for reprogramming, replacing transcription factors. The main reason for the replacement was because the majority of animals with iPSCs and their progeny increased potentially the incidence of tumors. However, according to new studies, this constitutes the most promising field for iPSCs' technology and actually, is the one that has more investigation made¹⁸. Tremendous innovation has occurred principally in the method of factor delivery and the type of somatic cells being reprogrammed³.

Delivery techniques

The initial delivery method were viral vectors. Their efficiency for cell reprogramming is variable. However, in some cases, the genome of the viral vector can integrate into the host genome and influence differentiation. This additionally activates an oncogene that can cause inflammation and even become into a cancerous cell²⁰⁻²³. The principal reason of the development of non-integrating approaches is to make iPSCs more therapeutically applicable⁴. A recent investigation showed the potential of electroporation-based transfection for delivery of transcription factors. Bulk electroporation (BEP) elaborates pores under the influence of an electric field, allowing the entry of transcription factors into the cell and posterior reprogramming²⁴⁻²⁶. There are no much chances for safe electroporation because the plasticity of the cell is usually affected²⁷.

After BEP failures, scientists started to develop a better method for the transfer of transcription factors. Researchers at Ohio State University Wexner Medical Center created the most recent technology, one that can reprogram cells with no damage, known as Tissue Nano transfection (TNT)²⁸. Its process is based on the direct cytosolic delivery of reprogramming factors into cells' outer membranes through temporary channels²⁷. They use a chip which is loaded with the required reprogramming factors and placed on the skin. A highly intense and focused electric field is applied, and the canals become opened²⁹. Then, they inject the desired genes, those reach the chosen somatic cells by vesicle transport and transform them²⁹. The technique has been successfully proved in two in vivo experiments. The first transformed adult skin cells into vascular cells and the other reprogrammed fibroblasts into induced neurons^{27,29}.

Conclusions

From the beginning of the discovery of reprogramming, there has been a vast advance which reflects the magnitude and the importance of the possible future results. There is still a lot of work to be done to understand the principles by which reprogramming happens in somatic cells but definitely, this technique is worth to continue with investigations. Right now, the technique that is being investigated the most is the one that uses transcription factors for reprogramming, however, there is also a recent (2016) research with non-synthetic mRNA that shows potential for its capacity of transforming somatic cells to an embryonic state and miRNA also showed to be powerful.

About the models of delivery, the more accurate process until now is tissue nanotransfection (TNT). It is the safer, inexpensive, more flexible, fast an antiviral. Possess a simple way for reprogramming, avoiding large laboratory processes and allowing the generation of any cell type and recovery of injured tissue, using the patients' own cells. Combination of this procedure with any of the factors used for reprogramming provides a promising future for this field.

Bibliographic references

1. Takahashi, K. Cellular reprogramming. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2014). doi:10.1101/cshperspect.a018606
2. Kim, T. K. & Eberwine, J. H. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* (2010). doi:10.1007/s00216-010-3821-6
3. Schmidt, R. et al. The roles of the reprogramming factors Oct4, Sox2 and Klf4 in resetting the somatic cell epigenome during induced pluripotent stem cell generation. *Genome Biol.* (2012). doi:10.1186/gb-2012-13-10-251
4. Maherali, N. & Hochedlinger, K. Guidelines and Techniques for the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* (2008). doi:10.1016/j.stem.2008.11.008
5. Patel, M. & Yang, S. Advances in Reprogramming Somatic Cells to Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev* (2010). doi:10.1007/s12015-010-9123-8
6. Yamanaka, S. Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future. *Stem Cell* (2012). doi:10.1016/j.stem.2012.05.005
7. Jaenisch, R. & Young, R. Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Cell* (2008). doi:10.1016/j.cell.2008.01.015
8. Sparman, M. et al. Epigenetic reprogramming by somatic cell nuclear transfer in primates. *Stem Cells* (2009). doi:10.1002/stem.60
9. Jiang, Z., Han, Y. & Cao, X. Induced pluripotent stem cell (iPSCs) and their application in immunotherapy. *Cellular and Molecular Immunology* (2014). doi:10.1038/cmi.2013.62
10. Anokye-Danso, F., Snitow, M. & Morrisey, E. E. How microRNAs facilitate reprogramming to pluripotency. *J. Cell Sci.* (2012). doi:10.1242/jcs.095968
11. Pourrajab, F., Babaei Zarch, M., BaghiYazdi, M., Hekmatimoghaddam, S. & Zare-Khormizi, M. R. MicroRNA-based system in stem cell reprogramming; differentiation/dedifferentiation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (2014). doi:10.1016/j.biocel.2014.08.008
12. Anokye-Danso, F. et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* (2011). doi:10.1016/j.stem.2011.03.001
13. Rohani, L. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells using non-synthetic mRNA. *Stem Cell Res* (2016). doi:10.1016/j.scr.2016.03.008
14. Education, N. Scitable glossary. Available at: <https://www.nature.com/scitable/definition/mrna-messenger-rna-160>. (Accessed: 20th December 2017)
15. Quabius, E. S. & Krupp, G. Synthetic mRNAs for manipulating cellular phenotypes: An overview. *N. Biotechnol.* (2015). doi:10.1016/j.nbt.2014.04.008
16. Liu, J. & Verma, P. J. Synthetic mRNA reprogramming of human fibroblast cells. in *Methods in Molecular Biology* (2015). doi:10.1007/978-1-4939-2848-4_2
17. Warren, L. et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* (2010). doi:10.1016/j.stem.2010.08.012
18. Xiao, X. et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells with Substitutes for Yamanaka's Four Transcription Factors. *Cell. Reprogram.* (2016). doi:10.1089/cell.2016.0020
19. Center, O. S. W. M. In vivo Therapeutic Reprogramming in Regenerative Medicine. (2017).
20. Bennington-Castro, J. Biofocus: Small tissue reprogramming device designed to heal damaged tissues. *Sci. Adv.* 3, e1701217 (2017).
21. Richards, S. Viruses affect cell reprogramming. (2012). Available at: <https://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/33019/title/Viruses-Affect-Cell-Reprogramming/>. (Accessed: 1st October 2017)
22. Zhou, Y. & Zeng, F. Integration-free Methods for Generating Induced Pluripotent Stem Cells. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* (2013). doi:10.1016/j.gpb.2013.09.008
23. Yang, Y., Leonand, M. & Gan, and H. Viral and Nonviral Cancer Gene Therapy. 1-51 (2016). doi:10.1142/9789813202528_0001
24. Chang, L., Chiang, C., Teng, L. & Jiao, Y. Nonviral Transfection Methods of Efficient Gene Delivery: Micro-/Nano-Technology for Electroporation. 175-2018 (2016). doi:10.1142/9789813202528_0005
25. Santra, T. S. & Tseng, F. G. Recent trends on micro/nanofluidic single cell electroporation. *Micromachines* (2013). doi:10.3390/mi4030333
26. Chang, L. et al. 3D nanochannel electroporation for high-through-

- put cell transfection with high uniformity and dosage control. *Nanoscale* (2016). doi:10.1039/C5NR03187G
27. Ktori, S. Chip Reprograms Skin into Any Cell Type. 34–36 (2017). doi:10.1089/gen.37.15.03
28. Center, O. S. W. M. Device instantly delivers new DNA or RNA into living skin cells to change their function. (2017). Available at: <https://www.sciencedaily.com/releases/2017/08/170807120530.htm>.
29. Gallego-Perez, D. et al. Topical tissue nano-transfection mediates non-viral stroma reprogramming and rescue. *Nat. Nanotechnol.* (2017). doi:10.1038/nnano.2017.134

Recibido: 21 diciembre 2017

Aprobado: 20 abril 2018

NEWS AND VIEWS / NOTICIAS Y OPINIONES

Schizophrenia related genes and its molecular treatments: systematic review and analysis.

Los genes relacionados con la esquizofrenia y sus tratamientos moleculares: revisión sistemática y análisis.

Isaac Bravo, Freddy Figueroa, Cristhian Preciado.

DOI: [10.21931/RB/2018.03.02.13](https://doi.org/10.21931/RB/2018.03.02.13)

Abstract: Schizophrenia is a mental disorder characterized by strong psychotic episodes of hallucinations and delusions, which affects, according to statistics, 1% of the world population. Although its pathogenesis remains unknown, multiple investigations suggest that several associations of chromosomal locus are responsible in the neurodevelopment of the disorder. This polygenic theory, shared by diseases such as cancer and diabetes, can also be influenced by environmental and epigenetic factors. Despite the existence of antipsychotic drugs that partially control the disease, these in many cases suppose counterproductive and ineffective effects. That is why a new research line on epigenetic factors and chromosomal associations, linked to the disorder origin, could lead to new pharmacological treatments that represent a real breakthrough.

Keywords: schizophrenia, candidate's genes, locus, dopamine, drugs, neurodevelopment, models.

Resumen: La esquizofrenia es un trastorno mental caracterizado por sus fuertes episodios psicóticos de alucinaciones y delirios, el cual afecta, según las estadísticas, al 1% de la población mundial. Aunque su patogénesis sigue siendo desconocida, múltiples investigaciones apuntan que varias asociaciones de locis cromosomales tienen relevancia en el neurodesarrollo del desorden. Esta teoría poligénica, la cual comparten enfermedades como el cáncer y la diabetes, también puede estar influenciada por factores ambientales y epigenéticos. A pesar de la existencia de fármacos antipsicóticos que controlan la enfermedad parcialmente, estos suponen en numerosos casos efectos contraproducentes y poco eficaces. Es por ello que una nueva línea investigativa sobre factores epigenéticos y asociaciones cromosomales, ligados a su origen, podrían conducir a nuevos tratamientos farmacológicos que supongan un verdadero avance.

Palabras clave: esquizofrenia, genes candidatos, locus, dopamina, fármacos, neurodesarrollo, modelos.

Introduction

Schizophrenia is considered a mental disorder that severely disrupts behavior, creating classic psychotic episodes of strong hallucinations and delusions^{1,2}. This disorder involves several neuromorphological and neurochemical abnormalities³. Among its symptoms, we can find the reduction of emotions, the disorganization of thought, the generation of language deficit, a several motivation decrease and the decrease on cognitive function^{1,4}. Schizophrenia is classified as the disease with the highest degree of chronic disability. Statistics show that at least 1% of the world population suffers schizophrenia^{3,5}, and that the hereditary factor of the disorder is between 80-85%⁶. Due to its high heritability index, its strong social impact and its devastating consequences, it has been named as one of the worst diseases affecting humanity^{1,7}. It is also proven that it is one of the diseases whose treatment is one of the most expensive in the world^{2,7}.

Although there is not enough evidence about the causes that originate schizophrenia, its pathogenesis is considered as a set of neurochemical factors associated with a cerebral malformation, possibly due to viral infections during pregnancy or obstetric complications^{1,8}. In recent decades much emphasis has been placed on this idea, and it is believed that the origin of schizophrenia is a consequence of possible neuronal alterations during the development of the central nervous system (CNS)^{7,9}. These alterations, even if they can be inherited or associated with the genetic load, also can be induced by

environmental or epigenetic factors⁷.

Thanks to advances in the study of genomics and the latest therapeutic tools developed in molecular biology, it is possible to perform analyzes in the genome of a population affected with this disease, and thus determine the genes involved in the formation of the disease¹⁰. Through investigations into the genetic material, it has been possible to deepen into the study of candidate genes or genes involved in the genomic alterations of people suffering from schizophrenic disorder¹¹. In this way, several chromosomal sectors have been selected, as well as small loci in certain chromosomes that may be related to the pathology¹⁰.

The purpose of the present article is to analyze multiple works and investigations about the different genes involved in the malformation of the CNS. Also, to explain the interaction of these genes with the disease and discuss the repercussion of alterations in the genome by epigenetic and environmental factors. Another objective of the article is to present the current molecular mechanisms that rule schizophrenia. We'll discuss the main actual molecular treatments applied to schizophrenia, make a comparison between the different techniques and present them according to their performance and efficiency. And finally, the effects of cannabis use on schizophrenia will be introduced and discussed.

¹ School of Biological Sciences and Engineering, Yachay Tech University, Urcuquí, Imbabura, Ecuador.

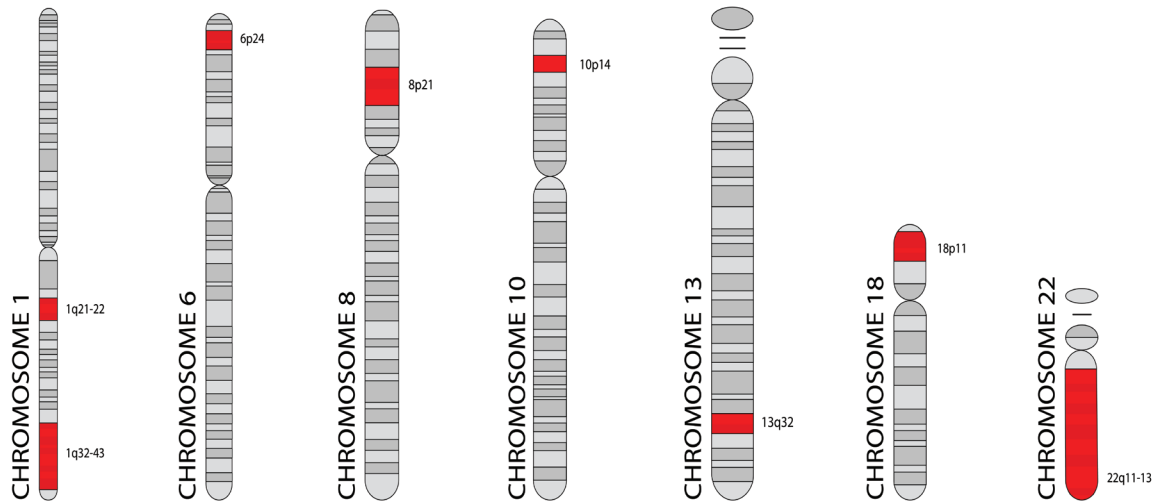


Figura 1. Chromosomal map with the locations of genes, marked with a red strip, related to some susceptibility to schizophrenia disorder, as Harrison P and Owen M. mentioned on their work.

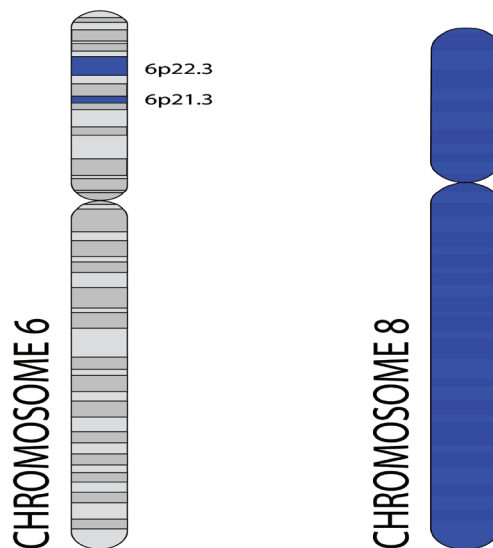


Figura 2. Chromosome 6 showing the locations of NOTCH4 gene and Dysbindin Protein 1 gene, marked with a blue strip, and chromosome 8.

Genetics of Schizophrenia

Recent genetic studies on the etiology of schizophrenia have been based on subjects such as the inheritance shared by consanguineous, the localization of possible chromosome groups responsible for the pathology and hypothetical genetic mechanisms which participate in the formation of the disorder, among others. Consequently, several models of transmission and genetic origin have been proposed for the disease¹². Among these we have:

Monogenic model: Which shows that all types of schizophrenia share the same gene but with a different level of penetration. The fact that only between 30% and 35% of the offspring of schizophrenic patients develop the pathology discredits this model.

Heterogenetic Model: It defines schizophrenia as a set of pathologies, associated with a greater locus, which are transmitted by inheritance, either dominant, recessive or linked

to the X chromosome. However, there is insufficient data or analysis in favour of this hypothesis.

Polygenic Model: It maintains that schizophrenia comes from the combination of multiple defective genes, with several interactions with the environment. This model proposes that the risk of developing schizophrenia is linked to a continuous distribution trait. This would explain why there are subclinical expressions in twins and other relatives of schizophrenic patients⁹.

In other studies, have been developed meta-analysis of the significance that has the inheritance for the development of this disorder, showing a rate of 80 to 85%¹³. In the same way they have calculated that the weight of the environmental factors is almost 11%. In relation to these studies, it has noted the existence of multiple chromosomal abnormalities; although it has not been possible to find a candidate gene of high reliability, several chromosome loci (as shown in Fig. 1) have

been proposed that present susceptibility to the disease that include 1q21-22, 1q32-43, 6p24, 8p21, 10p14, 13q32, 18p11 and 22q11-13^{10,14}.

A study on candidate genes, made in the Research Center of Cellular and Molecular Biology in Costa Rica, established that the chromosomes that would be linked with the development of schizophrenia within the population would be 1, 8, 13, 18 and 22¹⁵. But in view of the fact that none of these can cause the disease by itself, it has come to be the assumption that several genes could be combined in different ways in a number of individuals to generate the disease, and has created a possible model that integrates environmental factors in relation to the responsible genes. On the other hand, one of the major investigations carried out on schizophrenia, where 36989 cases and 113075 controls were studied and controlled, respectively, concluded with the finding of at least 128 genomic interactions between 108 chromosomal loci¹⁶. It was also determined that these associations were more numerous and frequent on chromosome 6^{17,18}.

Genetic and epidemiologic studies suggest to the polygenic model like a possible answer to the etiology of the schizophrenia, giving as an hypothesis the idea of multiple loci in the human genetic code, which provide minuscule individual effects increasing in the aggregation the risk of developing the disorder of substantial form^{13,19}. While the study and follow-up of individual cases provide strong inclinations towards the acceptance of a multigenic model, the study in families with schizophrenic history shows that like cancer, diabetes or diseases Cardiovascular, schizophrenia is a multiple genomic distortion characterized by a group of numerous "small" genetic inputs for the development of the disease²⁰. Other candidate genes that are mentioned by the Research Center of Cellular and Molecular Biology in Costa Rica are²¹:

NOTCH4: It's a gene located on the chromosomal locus 6p21.3 (Fig. 2), that whose encoded protein participates in the regulation of all types of tissues and organisms, giving a fate to cell organizations that receive their signal and those that do not. Animal studies show that the NOTCH family of proteins determines cell fate. Therefore, some authors find an association between this gene and the risk of schizophrenia²¹.

Dysbindin or Dystrobrevin-binding Protein-1: It's a neural tissue protein in which gene is located on chromosome 6p22.3 (Fig. 2). It forms part of the dystrophin complex. Its expression is given in the presynaptic terminals and participates in signal transduction. This protein can also decrease glutamate signaling, which links it as a precursor to schizophrenia²¹.

Neuregulin 1: This cell adhesion molecule (CAM), whose gene is located on chromosome 8 (Fig. 2), is consider to be a promoter of neuronal migration and cell differentiation. It is expressed in glutaminergic synaptic vesicles acting by means of NMDA receptors on the expression of glutamate and other neurotransmitter receptors^{21,22}.

Epigenetic studies have shown that environmental changes and epigenetic modifications in DNA have a fundamental role in prenatal and postnatal neurodevelopment²³. So much so that the epigenetic regulation during the formation of the CNS is a crucial point for the possible origin of the disease²⁴. A recent publication in Nature Neuroscience, after reviewing around 526 samples of post-mortem brains, asserts that any significant changes in epigenetic mechanisms during genome regulation in the stages of brain formation may be crucial to the onset of schizophrenic disorder. This is why there is a close relationship between epigenetic intermediaries and factors

that give rise to the disease²¹.

Molecular mechanisms linked to Schizophrenia

Once the different hypotheses about the etiological part of schizophrenia are approached and explained from a totally genetic focus, it's time to introduce the molecular mechanisms associated with the disorder. We must know that there are several hypotheses linked to the molecular mechanisms that trigger the symptoms of schizophrenia. The dopaminergic hypothesis is the one that has prevailed during the last decades, being even the most accepted model by the scientific community. This hypothesis holds that the symptoms of this disorder are due to an excess of dopamine or a high sensitivity of this neurotransmitter. Evidence shows that dopamine is one of the neurotransmitters responsible for the genesis of schizophrenia and also affects other neurotransmission systems. It is also suggested that the disorder may be closely linked to a hyperactivation of cerebral dopaminergic pathways. Therefore, it is suggested that schizophrenia is linked to dysregulation of the dopaminergic factor^{11,23}.

On the other hand, another hypothesis currently accepted for the community involves the neurotransmitter serotonin as the main responsible for the disease. Wooley and Shaw (1994) pioneers of the hypothesis, which states that schizophrenia is due to a deficiency in serotonergic function in the CNS. In addition, it describes the trophic role of serotonin in neurodevelopment, its activity in the dopaminergic system and its effects in the prefrontal cortex through 5HT2A receptors. In fact, it has been proving that serotonin has an inhibitory effect in the dopaminergic complex system. So the antipsychotic arresters of serotonergic factors disinhibit the dopaminergic factors improving the patient's behavior^{25,26}.

Most common treatments against Schizophrenia

RSchizophrenia for some time that is one of the most studied diseases by the human being, therefore many treatments have been elaborated by doctors and investigators to prevent, to cure or to attenuate the complications that this disorder entails. These treatments vary according to the phase or severity of the disease. One of the suggested treatments, based on all of these studies, is primarily on the use of antipsychotic drugs (AP). Although this treatment has its limitations and adverse effects, it is a proven fact that its application can significantly improve the symptoms of schizophrenia. The selection of these AP's, in turn, is delimited by certain parameters such as the antecedents of response to previous treatments, the profile of adverse effects of the drug, the cost of production and its possible side effects^{27,28}.

There are two types of antipsychotics used as medication in schizophrenia: Typical or classic antipsychotics, and atypical or recent. The first ones are characterized by being competitive antagonists of the dopaminergic receptors. These are effective but do not provide optimal treatment, because they produce many undesirable effects. This is why they are considered to be of low acceptance by the patients. On the other hand, the atypical AP focus on the increase of the selectivity antidopaminergic or that are antiserotonergic and at the same time antidopaminergic. The latter are more effective because they have less incidence of side effects and little ability to produce catalepsy. Recent AP, unlike typical AP's that are equipotential, block strongly induced hyperlocomotion. Of all this, we can conclude that it is necessary to improve the efficacy of these drugs or to produce new antipsychotics with a lower probability of inducing collateral or counterproductive effects^{27,28}.

The principal antipsychotic that marked a treatment against schizophrenia was chlorpromazine⁵. This phenothiazine antipsychotic is an antagonist of dopamine D2 receptors and similars, such as D3 and D5. It blocks the serotonergic receptors 5-HT1 and 5-HT2 in such a way that increases the neural dopaminergic activity and induces anxiolytic and anti-aggressive effects. Also, it has been proven to attenuate the extrapyramidal effects. However, as any drug, this AP has adverse effects, which is why many of the patients who are treated with this AP usually leave treatment because it worsens their quality of life by producing counterproductive effects like anemic degeneration, hypotension, sedation, gain of weight and difficulty in ejaculation. In addition, chlorpromazine blocks M1 and M2 muscarinic receptors. This arrest of M receptors leads to adverse side outcome by generation of anticholinergic effects such as constipation, dry lips, blurred vision and sinus tachycardia²⁷.

Several studies carried out in patients with schizophrenia in China lead us to analyze another drug antipsychotic, risperidone. This antipsychotic has been used enormously in the treatment and therapy of schizophrenia and other psychotic illnesses. This drug is metabolized to 9-Hidroxisperidona and, similar to chlorpromazine²⁹, is an antagonist of the dopaminergic receptor D2⁵. The response of Risperidone has a great variability that depends on the environmental, physiological, genetic and epigenetic factors. The latter can modulate the expression of the main genes responsible for the metabolism and distribution of drugs. There are studies focused on a few candidate genes, recently 14 candidate genes have been related to the treatment of schizophrenia using risperidone. Analyzing this, risperidone has shown efficacy, but with susceptibility to epigenetic factors mainly³⁰.

Various experiments with good results in Brazil lead to clozapine, an antipsychotic that has proven to be quite effective. Its efficacy is due to its action against serotonin receptors (5-HT2A), dopaminergic (D1, D2, D3, D4), histaminergic, adrenergic and cholinergic. In clinical practices, the use of clozapine in patients with schizophrenia has had a great impact, we can assert that approximately 50% of individuals who did not respond satisfactorily to treatment with typical antipsychotics, did with this drug. But, similar to the antipsychotics mentioned above, it has adverse effects such as hypersalivation, sedation, dizziness, headaches, drowsiness, hypotension, among others³¹.

Cannabis use and Schizophrenia

Cannabis is one of the illicit drugs most known worldwide. It has been object of study because of its effects on the nervous system. In fact, evidence suggests that cannabis use has a linkage with schizophrenia symptoms; however, it is still unclear whether this is because of the effect of cannabis on psychosis progress or whether genes that increase cannabis use are the same that increase psychosis risk. Furthermore, it is well established that cannabis is used much higher among people who suffers schizophrenia than in the general population⁶.

During the last decades, cannabis use has increased until reach the title of being the most used drug around the world according to the information given by the United Nations Office on Drugs and Crime, and as its use increases, psychotic disorders and schizophrenia appearance also increase. Knowing the healthy aspects from schizophrenia and other psychotic disorders, the approach of use of cannabis as a cause of schizophrenia has impinged on discussion over the legislation su-

rounding its use⁶. Nonetheless, this linkage between the disease and the drug seems to be more complicated to analyze. Several studies have stated that using cannabis is a risk factor for psychosis. Ferdinand and collaborators found that the relation is bidirectional³². Notwithstanding, other experiment failed when it tried to obtain the same finding^{6, 33}.

Results from researchers working on the study of the association between cannabis and schizophrenia show that it is due to a shared genetic etiology across common variants. They propose the idea that people who are more likely to ingest cannabis are those who are genetically predisposed to schizophrenia. This idea states that this association, at least a part of it, presents a causal relationship in the opposite direction. In addition, if this association is completely right, it would not rule out the possibility of cannabis being a risk factor for such disorder. These findings are important to understand the effects of cannabis in schizophrenia development and to conclude saying that there is a relation, independently of what kind of association is⁶.

Discussion

We can say that, despite the great amount of studies and analysis about the complexity of genetics that presents the development of schizophrenia, is still unknown how the implicated molecular mechanisms are. It is considered that the most acceptable form to analyze the pathogenesis is with a serie of major and minor contributions from a set of locus associated with multiple chromosomes. This idea of multiple genetic contributions conforms the polygenic model, which seems to be a model that explain the etiology of the schizophrenic spectrum. On the other hand, there is also enough evidence to propose the existence of a linkage between the development of the disease and the ambiental and epigenetic factors. Other alleged responsables of the development of the disease, is the consume of cannabis, which effect in nervous system play a big role in the etiology of the disorder. Even though it's not discovered yet the precise relationship between cannabis and schizophrenia, it is proved that its consumption means a risk factor for the onset of schizophrenia. Another important approach that have to be taken into account in the study of schizophrenia is the behaviour of patient in the society. This allow to analyze thoroughly the epigenetic factors that are involved in the development of the disorder and which of them participates on the genetic heritability.

Finally, there are still a few lines of researching, where molecular techniques supposed to be a progress against the illness. In other words, techniques that support directly the profound study of the chromosomal linkages and obtain new successful pharmacological treatments from that analysis. Furthermore, emerging investigations about genetic mechanisms could reveal new manners of pharmacologic development, and could even reach the generation of a model for polygenic diseases treatments. This could suppose a strong social advancement if we consider that, nowadays, drugs used such as chlorpromazine, risperidone and clozapine, which are antagonists of antidopaminergic and antiserotonergic receptors, have secondary perjudicial and counterproductive effects for the patients. Principally, the chlorpromazine, which often presents a setback for the schizophrenia treatment. Antipsychotics have been of great utility, yet their counter effects lead us to continue studying the nature of schizophrenia, its causes and its repercussions.

Conclusions

Due to the large number of chromosomal associations that this disease presents, it is difficult to find candidate genes from which to hypothesize that its regulation prevents the development of the disease or even manages to cure it. Although it is practically a fact that certain environmental changes and epigenetics play a very important role in the birth of the disease, there are still few studies about the influence and what types of epigenetic mechanisms are responsible for schizophrenia. It should be noted that even knowing that genomics has a lot to do with the malformation of the CNS, which leads to the development of disorder, there are few investigations applying molecular techniques different from drugs for its treatment.

There are few AP that perform in instances a serious regulation on schizophrenic patients, they are still an inefficient and expensive way of treating the disease. Association between cannabis use and schizophrenia is not completely determined yet because there are different results when trying to identify the type of relation, nevertheless it is a fact that cannabis has several implications on the development of such disorder.

Bibliographic references

1. Aguilar Á. Identificación de factores genéticos en la etiología de la esquizofrenia. *Sistema de Información Científica Redalyc*. 2011 July; 16(3).
2. Gejman P, Sanders A. La etiología de la esquizofrenia. 2012; 72(3).
3. Giménez C. Bases moleculares de la esquizofrenia. 2012 November .
4. Mediavilla J. Esquizofrenia. Londres: Royal College of Psychiatrists, Consejo Editorial de Educación Pública; 2009.
5. Tamminga CA. The promise of new drugs for schizophrenia treatment. 1997 April; 42(3).
6. Power R, Verweij K, Zuhair M, Montgomery G, Henders A, Heath A, et al. Genetic predisposition to schizophrenia associated with increased use of cannabis. *Molecular Psychiatry*. 2014 June; 19.
7. Salamanca D, Vergara J, Escobar FRÁ, Caminos J. Avances genéticos y moleculares en el estudio de trastornos mentales. *Revista Facultad Medica*. 2014; 62(2).
8. Sacchi S, Rosini E, Pollegioni L, Molla G. D-Amino Acid Oxidase Inhibitors as a Novel Class of Drugs for Schizophrenia Therapy. *Current Pharmaceutical Design*. 2013; 19.
9. Obiols J, Vicens-Vilanova J. Etiología y Signos de Riesgo en la Esquizofrenia. *International Journal of Psychology and Psychological Therapy*. 2003; 3(2).
10. Consenso Nacional y Guía de Práctica Clínica de la Asociación Psiquiátrica Mexicana y de la Asociación Psiquiátrica de América Latina para el tratamiento de las personas con esquizofrenia. *Salud Mental*. 2014;37(1):VII-118.
11. Obiols J, Carulla M. Bases biológicas de la esquizofrenia: Aspectos Neuroquímicos y Neuroanatómicos. 1998; 6(1).
12. Yrjö A. LA ESQUIZOFRENIA. In Sanz ME, editor. LA ESQUIZOFRENIA: Sus Orígenes y su Tratamiento Adaptado a las Necesidades del Paciente. Madrid: Editorial H. Karnak Ltd.; 2003. p. 23-37.
13. Wang Q, Ji W, He K, Li Z, Chen J, Li W, et al. Genetic analysis of common variants in the ZNF804A gene with schizophrenia and major depressive disorder. 2017 September; 27.
14. Harrison P, Owen M. Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet*. 2003 February ; 361.
15. Bolaños S. Análisis epistémico del modelo biológico para explicar el origen de la esquizofrenia. *Sistema de Información Científica Redalyc*. 2003; 19(106).
16. O'Tuathaigh C, Moran P, Zhen X, Waddington J. Translating advances in the molecular basis of schizophrenia into novel cognitive treatment strategies. 2017 October; 174(19).
17. Morris B, Pratt J. Novel treatment strategies for schizophrenia from improved understanding of genetic risk. 2014 November; 86(5).
18. Howes O, et al. Treatment-Resistant Schizophrenia: Treatment Response and Resistance in Psychosis (TRRIP) Working Group Consensus Guidelines on Diagnosis and Terminology. *The American Journal of Psychiatry*. 2016 December; 174(3).
19. Valiente A, Lafuente A, Bernardo M. Revisión sistemática de los Genomewide Association Studies (GWAS) en esquizofrenia. *Revista de Psiquiatría y Salud Mental*. 2011 September; 4(4).
20. Harrison P, Weinberger D. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Nature*. 2005; 10.
21. Pacheco A, Raventós H. Genética de la esquizofrenia: avances en el estudio de genes candidatos. *Revista de Biología Tropical*. 2004 September; 52(3).
22. Xavier RM, Vorderstrasse A, Keefe R, Dungan J. Genetic correlates of insight in schizophrenia. Elsevier. 2017 October.
23. Saiz J, de la Vega D, Sánchez P. Bases Neurobiológicas de la Esquizofrenia. *Clínica y Salud*. 2010; 21(3).
24. Ovendena E, McGregora N, Emsleyb R, Warnicha L. DNA methylation and antipsychotic treatment mechanisms in schizophrenia: progress and future directions. 2017 October;(17).
25. Graff A, Apiquian R, Fresán A, García M. Perspectiva neurobiológica de la esquizofrenia. *Sistema de Información Científica Redalyc*. 2001 December; 24(6).
26. Wooley DW, Shaw E. A biochemical and pharmacological suggestion about certain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1954 April; 40(4).
27. Cabildo A, González M, Hernández M, Quintanar V, Sayago A. Diseño basado en quimiinformática y estudios de acoplamiento molecular de análogos de Clorpromazina para disminuir los efectos secundarios en el tratamiento de la esquizofrenia. 2016; 3(1).
28. Tajima K, Fernández H, López-Ibor JJ, Carrasco J, Díaz-Marsá M. Tratamientos para la esquizofrenia. Revisión crítica sobre la farmacología y mecanismos de acción de los antipsicóticos. *Actas Esp Psiquiatría*. 2009; 37(6).
29. Ghafelehbashi H, Kakhki M, Kular L, Moghbelinejad S, Ghafelehbashi S. Decreased expression of IFNG-AS1, IFNG and IL-1B inflammatory genes in medicated Schizophrenia and Bipolar patients. 2017 October.
30. Shi Y, Li M, Song C, Xu Q, Huo R, Shen L, et al. Combined study of genetic and epigenetic biomarker risperidone treatment efficacy in Chinese Han schizophrenia patients. *Nature*. 2017 May; 7.
31. Barzotti F. Pharmacogenetics in schizophrenia: a review of clozapine studies. *Revista Brasileira de Psiquiatría*. 2013 September; 35(3).
32. Ferdinand R, Sondejker F, van der Ende J, Selten J, Huizink A, Verhulst F. Cannabis use predicts future psychotic symptoms, and vice versa. *Addiction*. 2005 May; 100(5).
33. Fergusson D, Horwood L, Ridder E. Tests of causal linkages between cannabis use and psychotic symptoms. *Addiction*. 2005 March; 100(3).

Recibido: 20 noviembre 2017

Aprobado: 21 mayo 2018