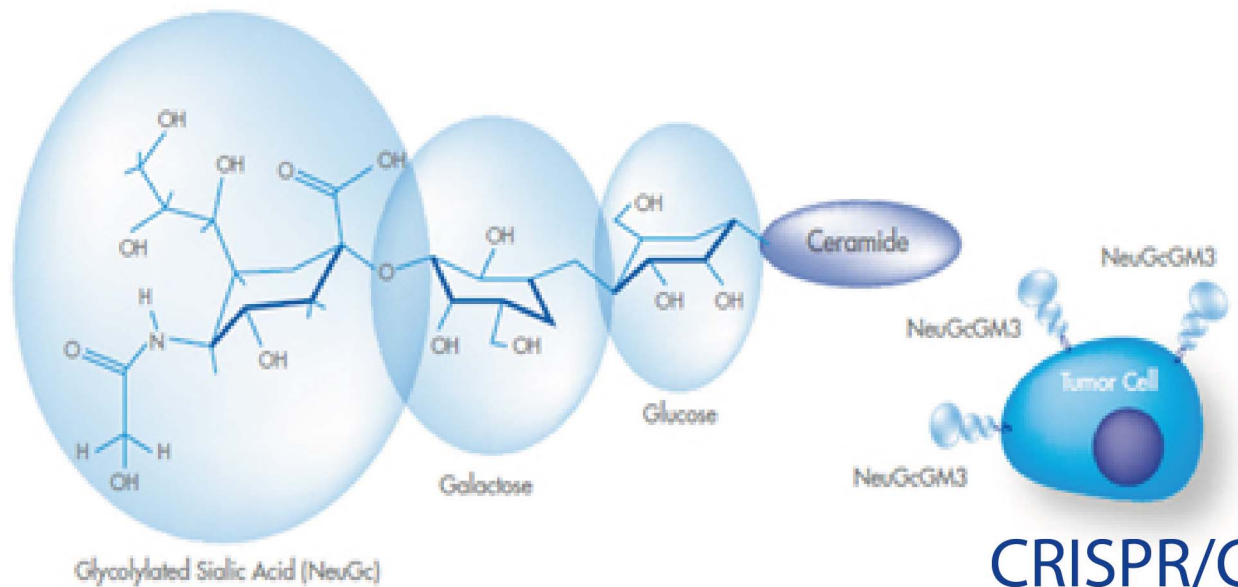


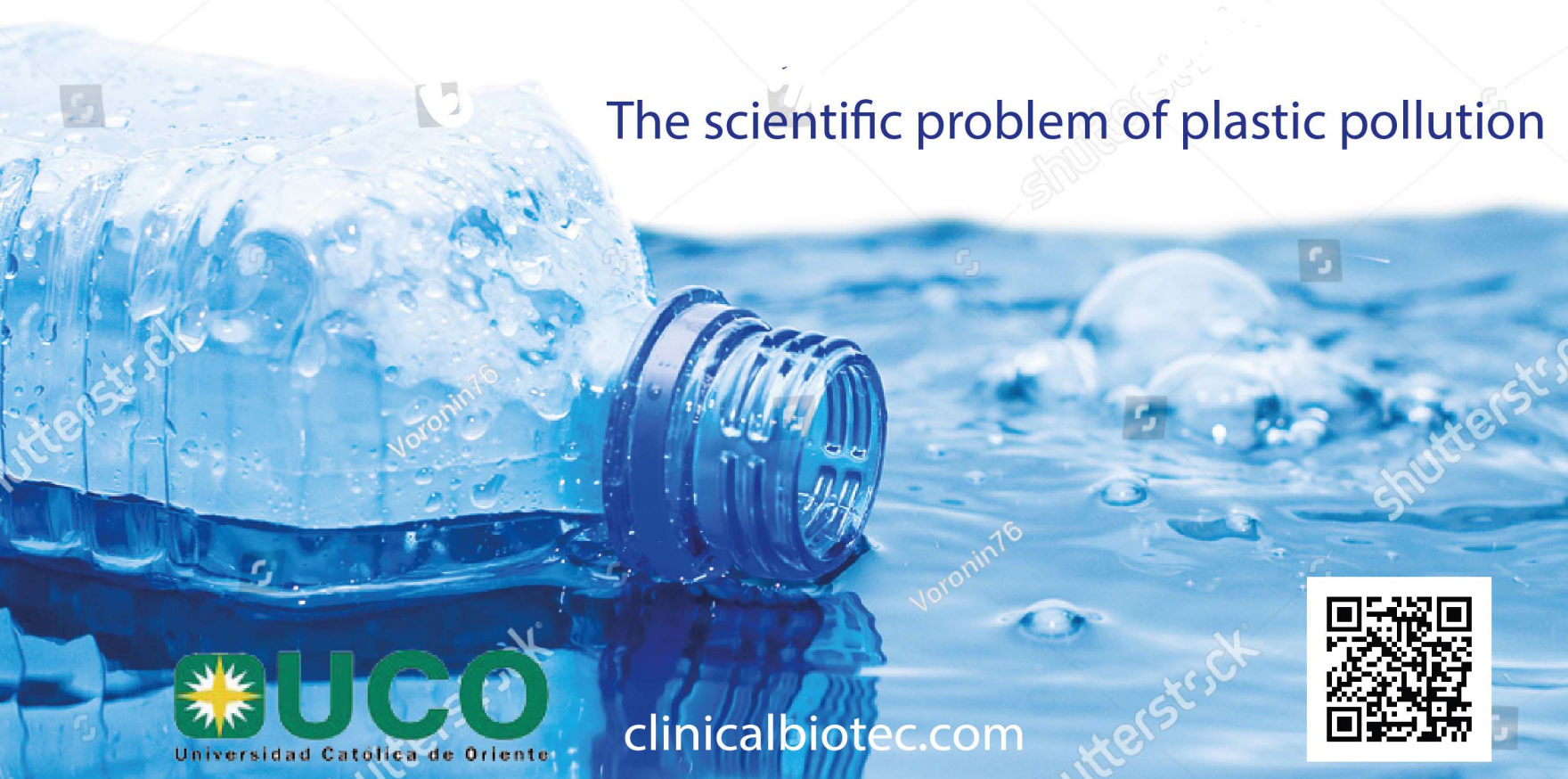
# Bionatura

## Inmunoterapia activa en cáncer de pulmón

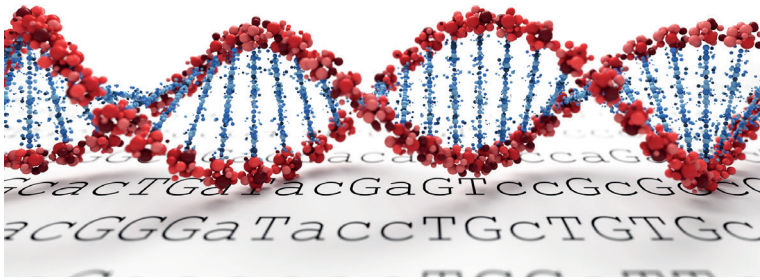


CRISPR/Cas9

## The scientific problem of plastic pollution



# Bionatura



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

## Equipo editorial

### Editor Jefe / Chief Editor

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

### Consejo Editorial / Editorial Board

-Dr. Fernando Albericio. Ph.D. Full Professor. University of KwaZulu-Natal. Durban, South Africa  
 -Dr. Spiros N. Agathos, Ph.D. Full Professor and Dean, School of Life Sciences and Biotechnology Yachay Tech University, Ecuador.  
 -Dra. Hortensia María Rodríguez Cabrera. Ph.D. Full Professor and Dean, School of Chemical Sciences and Engineering Yachay Tech University, Ecuador.  
 -Dr. Gerardo Ferbeyre. Full Professor. Département de biochimie. Faculté de Médecine. Université de Montréal, Canadá.  
 -Dr. Eduardo López Collazo. Director IdiPAZ Institute of Biomedical Research, La Paz Hospital, España.  
 Dr. Yovani Marrero-Ponce. Ph.D. Full Professor. Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Quito, Ecuador  
 -Dr. Manuel Limonta. Prof. PhD. Director: Regional Office for Latin American and the Caribbean International Council for Science (ICSU). Doctor honoris causa Autonomous Metropolitan University of México City (UAM). Dr. Honoris Causa - Universidad Central Ecuador. Dr.  
 -Dr. Michael Szardenings. PhD. Ligand Development Unit. Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology. Germany  
 -Dra. Luciana Dente. Research Professor University of Pisa, Italy.  
 -Dr. Dagoberto Castro Restrepo. PhD, Profesor / Director Research and Development. Catholic University of the East. Rionegro-Antioquia / Colombia  
 -Dr. Frank Alexis. Research / Full Professor. Yachay Tech University, Ecuador  
 -Dr. Si Amar Dahoumane. Research / Professor. Yachay Tech University, Ecuador  
 -Dr. Amit Chandra, MD, MSC, FACEP Global Health Specialist, Emergency Physician Millennium Challenge Corporation, London School of Economics and Political Science.  
 -Dr. Amina Sánchez Rodríguez. PhD. Director del departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Técnica Particular de Loja  
 -Dra. Thelvia I. Ramos Gómez. MD, Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Ecuador.  
 -Dr. Oliberto Sánchez. Profesor Asociado. Universidad de Concepción, Chile.  
 -Dr. Jorge Roberto Toledo. Profesor Asociado. Universidad de Concepción, Chile.  
 -Dr. Silvio e. Perea. PhD. Head of the Molecular Oncology Laboratory. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Cuba  
 -Dra. Daynet Sosa del Castillo. PhD. Directora del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador. CIBE-ESPOL  
 -Dra. Lilian Spencer. PhD. Profesora Investigadora. Universidad de Yachay Tech, Ecuador.  
 -Dra. Consuelo Macías Abraham. Especialista de II Grado en Inmunología, Investigadora y Profesora Titular, Doctora en Ciencias Médicas y Miembro Titular de la Academia de Ciencias de Cuba. Directora del Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), de La Habana, Cuba.  
 -Dr. René Delgado. PhD. IFAL / Presidente Sociedad Cubana de Farmacología. Cuba  
 -Dr. Ramón Guimil. Senior Director. Oligonucleotide Chemistry bei Synthetic Genomics, Estados Unidos.  
 -Dra. Vivian Morera. PhD. Profesora Investigadora. Universidad de Yachay Tech, Ecuador.  
 -Dr. Eduardo Penton. MD, PhD, Investigador Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba  
 -Dr. Julio Raúl Fernández Massó, PhD, Investigador Titular. Centro de

Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba

-Dr. Luis Trujillo. Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Ecuador.  
 -Dra. Lisset Hermida. Investigadora Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba  
 -Dr. Tirso Pons. Staff Scientist. Structural Biology and Biocomputing Programme (CNIO), España.  
 -Dr. Che Serguera. French Institute of Health and Medical Research. MIRcen, CEA, Fontenay-aux-Roses Paris, France  
 -Dra. Maritza Pupo. Profesora investigador. Facultad de Biología. Universidad de la Habana, Cuba.  
 -Dr. Fidel Ovidio Castro. Founder, Profesor investigador. Tecelvet, Chile  
 -Dra. Olga Moreno. Partner, Head Patent Division. Jarry IP SpA, Chile.  
 -Dr. Carlos Borroto. Asesor de Transferencia de Tecnología. Dirección General at Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY), México.  
 -Dr. Javier Menéndez. Manager Specialist Process and Product 5cP. Sanofi Pasteur, Canadá.  
 -Dr. Fran Camacho. PHD Researcher. Universidad de Concepción, Chile  
 -Dr. Pedro Valiente. Profesor investigador. Facultad de Biología. Universidad de la Habana, Cuba.  
 -Dr. Diógenes Infante. Prometeo / SENESCYT. Especialista de primer nivel en Biotecnología. Universidad de Yachay Tech, Ecuador.  
 -Dra. Georgina Michelena. Profesora Investigador. Organización de las Naciones Unidas. (ONU), Suiza.  
 -Dr. Francisco Barona, Profesor Asociado. Langebio Institute, México  
 -Dr. Gustavo de la Riva. Profesor Investigador Titular. Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, México.  
 -Dr. Manuel Mansur. New Product Introduction Scientist (NPI) at Elanco Animal Health Ireland, Irlanda.  
 -Dr. Rolando Pajón. Associate Scientist, Meningococcal Pathogenesis and Vaccine Research. Center for Immunobiology and Vaccine Development, UCSF Benioff Children's Hospital Oakland", Estados Unidos.  
 -Dr. José Manuel Pais Chanfrau. Universidad Técnica del Norte, Ecuador.  
 -Dra. Ileana Rosado Ruiz-Apodaca. Profesor / Investigador. Universidad de Guayaquil, Ecuador.  
 -Dr. Carlos Eduardo Giraldo Sánchez. PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia  
 -MSc. Nubia Yineth Velásquez Velásquez. Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia  
 -Dr. Mario Alberto Quijano Abril. PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia  
 -Dr. Samir Julián Calvo Cardona. PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia  
 -Dr. Felipe Rojas Rodas. PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia  
 -Dra. Isabel Cristina Zapata Vahos, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia  
 -Dr. Felipe Rafael Garcés Fiallos, PhD. Profesor / Investigador. Vicerrectorado de Investigación, Gestión Social del Conocimiento y Posgrado Universidad de Guayaquil (UG), Ecuador  
 -Dra. Marbel Torres Arias. Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Ecuador.  
 -Dr. Rachid Seqqat. Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Ecuador.  
 -Dra. Celia 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/mbelvacouver.htm#ilustraciones%20\(figura\)](http://www.fisterra.com/recursos_web/mbelvacouver.htm#ilustraciones%20(figura))

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

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

# Bionatura

La **Revista Bionatura** es un medio especializado, interinstitucional e interdisciplinario, para la divulgación de desarrollos científicos y técnicos, innovaciones tecnológicas, y en general, los diversos tópicos relativos a los sectores involucrados en la biotecnología, tanto en Ecuador como en el exterior; así mismo, la revista se constituye en un mecanismo eficaz de comunicación entre los diferentes profesionales de la biotecnología.

Es una publicación sin ánimo de lucro. Los ingresos obtenidos por publicidad o servicios prestados serán destinados para su funcionamiento y desarrollo de su calidad de edición. (<http://revistabionatura.com/media-kit.html>)

Es una revista trimestral, especializada en temas concernientes al desarrollo teórico, aplicado y de mercado en la biotecnología.

Publica artículos originales de investigación y otros tipos de artículos científicos a consideración de su consejo editorial, previo proceso de evaluación por pares (peer review) sin tener en cuenta el país de origen.

Los idiomas de publicación son el Español e Inglés.

Los autores mantienen sus derechos sobre los artículos sin restricciones y opera bajo la política de Acceso Abierto a la Información, bajo la licencia de Creative Commons 4.0 CC BY-NC-SA (Reconocimiento-No Comercial-Compartir igual).

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

**Nuestros contactos deben ser dirigidos a:**  
Revista Bionatura: [editor@revistabionatura.com](mailto:editor@revistabionatura.com)

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

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

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

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

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

## EDITORIAL

- The scientific problem of plastic pollution: an ocean of reports with little standardization of procedures 571  
*El problema científico de la contaminación plástica: un océano de informes con poca estandarización de procedimientos*  
Bionatura guest editors: Alonzo Alfaro-Núñez and Rafael Bermudez

## LETTER TO EDITOR / CARTA AL EDITOR

- Inmunoterapia activa en cáncer de pulmón, nuevas opciones terapéuticas 574  
*Active immunotherapy in lung cancer, new therapeutic options*  
Thelvia I Ramos

## RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

- Evaluación de Racotumomab para el tratamiento del cáncer de pulmón: meta-análisis de ensayos controlados del CIM 577  
*Evaluation of Racotumomab for the treatment of lung cancer: meta-analysis of controlled trials of the CIM*  
Carmen Viada, Javier Quintero, Javier Ballesteros, Martha Fors, Mayteé Robaina, Mabel Alvarez, Aliuska Fría, Saily Alfonso, Amparo Macías, Maurenis Hernández.
- Effect of the intensive exploitation and forest fragmentation in the genetic structure of *P. oleifolius* in the Colombian Central Andes 583  
*Genética poblacional de la especie amenazada de pino Podocarpus oleifolius D. Don ex Lamb. en bosques de la cordillera central Andina en Colombia*  
Juan C Álvarez-díaz, Diego Ospina-Zapata, W. Rojas, M. A Quijano-Abril.
- Efecto del carbón activado en la germinación y brotación in vitro de *Citrus limon* (L.) y su dinámica de crecimiento 591  
*Effect of activated charcoal on in vitro germination and shoot multiplication of Citrus limon (L.) and its growth dynamics*  
Ivonne Vaca, Miguel Marulanda, Joana Verdesoto, Alejandro Núñez, Ramiro Daniel Acurio, Viviana Chiluisa-Utreras
- Reducción de emisiones de CO y CO<sub>2</sub> al medio ambiente con mezclas B5 y B10 de biodiesel a base de algas (*Chlorella*) 595  
*Reduction of CO and CO<sub>2</sub> emissions to the environment with B5 and B10 mixes of biodiesel based on algae (Chlorella)*  
Carlos Nolasco Mafla Yépez, Ignacio Bayardo Benavides Cevallos, Erik Paúl Hernández Rueda, Edwin Salomón Arroyo Teran, Fernando Renato Ramírez

---

Disminución de grasa corporal local utilizando hidrolipoclusia 599  
*Decrease in local body fat using hydrolipoclusia*

*Esteban Waliszewski Zamorano, Marco Antonio Conde Pérez, Daisy Irais Nava Morales, Stephany Angelina Aguila Mora.*

---

## CASE REPORTS / REPORTE DE CASO

---

Sinus histiocytosis in cervical adenopathy, case report 604  
*Histiocitosis sinusal en adenopatía cervical única, reporte de caso*

*Diego Valarezo-Sevilla, Mario Alexei Buitrón-Ortega, Adonis Frómata-Guerra, Lourdes Rodríguez-Ramírez, Vanessa Sarzosa-Terán, Sandra Sánchez-Figueroa*

---

## REVIEW / ARTÍCULO DE REVISIÓN

---

La farmacogenómica en el desarrollo de la inmunoterapia específica de alérgenos y autoantígenos 607

*The pharmacogenomic in the development of the autoantigen- and allergen- specific immunotherapy*

*Mainet-González D.*

---

Recombinant Human Erythropoietin. The problem of glycosylation 617  
*Eritropoyetina Humana Recombinante. El problema de la glicosilación*

*Doménica Encalada Barahona, Mateo Flores Naranjo, Camila Viera Herrera*

---

## NEWS AND VIEWS / NOTICIAS Y OPINIONES

---

Application of the technique CRISPR/Cas9 in the reduction and permanent inactivation of Huntington's Disease 623  
*Aplicación de la técnica CRISPR / Cas9 en la reducción e inactivación permanente de la enfermedad de Huntington*

*Sofía Abad-Sojos, Odalys Torres, Kerly León Ordóñez*

---

## EDITORIAL

# The scientific problem of plastic pollution: an ocean of reports with little standardization of procedures.

## El problema científico de la contaminación plástica: un océano de informes con poca estandarización de procedimientos.

Bionatura guest editors: Alonzo Alfaro-Núñez<sup>1,2</sup> and Rafael Bermúdez<sup>3,4</sup>.

DOI. 10.21931/RB/2018.03.03.1

As any other new area of research during its genesis, the study of plastic pollution in the oceans currently lacks an international consensus on procedures to ensure standardization of results. When a phenomenon, problem or issue firstly appears or it is discovered and recognized, there is no guideline, protocol or general approach on how to measure, quantify or evaluate it. More importantly, there is no general agreement on how to transmit this new knowledge in order to standardize results across research groups, states and regions. This is exactly the current state of knowledge generated around the subject of plastic pollution in the environment, and more specifically in the oceans.

To aggravate even more the lack of a standardized protocol for plastic pollution detection and quantification, today's social media have the "absolute power" to deliver information to the general public. As such, social networks turn news feed viral in minutes; millions of people can receive this information, which is then cognitively transformed into facts. Very few questions are raised as to whether or not this new information has actually been scientifically proved. As such, news in social media becomes more believable than science itself.

Plastic pollution is indeed a global problem, especially in the oceans as it has repeatedly been reported<sup>1-3</sup>. The real problem lies in the fact that there are so many scientific and non-scientific reports with different procedures following a myriad of protocols and methodologies, and so far no one can assertively attest as to what is accurate. All of the current reports, at the same time, claim to deliver new procedures with results that provide evidence to the dispersal of plastic particles and how they may dissolve in the oceans.

To assess plastic pollution has become a popular subject. In many ways it seems kind of obvious and simple, plastic pollution is ubiquitous<sup>1,3,4</sup>. It can be found in our parks, forests, rivers, lakes and oceans; possibly also in our food, drinking water and air; thus just go and collect your own sample and analyse it, as you deem convenient. All this makes these results impossible to compare, therefore creating a fragmented pool of knowledge.

Under the current and rather confusing context of approaches, it is important to start by defining what the problem is, and what is the main issue surrounding plastic pollution in the oceans. Next, we present and explain briefly, to our understanding, some general background of the current status of plastic pollution in the marine environment.

Plastic pollution in the oceans is directly correlated with this material being inexpensive, versatile, robust and durable, which is linked to the high amounts of plastics produced, used and easily discarded.

Our current knowledge on the effects of large plastic fragments on marine diversity is still limited. Hundreds of species of fish, seabirds, turtles, and marine mammals have been documented to become entangled or to ingest pieces of plastics like ropes, fish nets, plastic bags, etc., which may result in ulceration or starvation<sup>5</sup>. Plastic contamination contributes to the alarming estimation that at least one-third of all marine species are now threatened with extinction<sup>6</sup>. This phenomenon receives significant media coverage and usually produces shocking images of dead charismatic animals like sea turtles, whales, birds, etc., and thus it is the issue that most people are familiar with.

Although plastic can eventually disintegrate into smaller pieces down to the molecular level, it remains intact as plastic polymers (the main blocks that form and hold the plastic structure together) and attracts persistent organic pollutants (POPs) such as dioxins and 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl) ethylene also known as DDE, on top of the toxic chemicals they already contain (e.g. bisphenol A (BPA) and flame retardants).

Plastic polymers are not processable in their natural form; hence they are mixed with plastic additives. As such, plastic additives comprise a large number of chemical substances such as flame-retardants, surfactants, blowing agents, and plasticizers. However, most plastic additives are often not covalently bound to the original plastic polymer matrix, therefore they can slowly diffuse out of plastics leading to wide environmental contamination<sup>7</sup>, becoming POPs. These POPs compounds are toxic, bioaccumulative and subjected to long-range transportation in the ocean. The list of POPs in the Stockholm Convention consists of 20 compounds including BPA, chlorinated pesticides, chlorinated industrial chemicals, bromina-



**Figure 1.** Plastic products are currently a threat to the marine environment, as they break up into micro and nano plastic particles into the oceans (Photo art by Allan Jeffs).

ted flame-retardants (BFRs) and one fluorinated surfactant. However, there are hundreds of other POPs in production, e.g. out of the 75 commercially recognized BFRs, only 3 groups are on the list; and of the more than 115 poly- and perfluorinated surfactants found in industrial blends<sup>8</sup>, only one is on the list.

Simultaneously, POPs have been suggested as a potential cofactor for the increase of infectious diseases and the large viral diversity found in marine environments<sup>9</sup>. Thus, environmental plastic contaminants may be directly involved in the dramatic decrease of marine wildlife, and the increase of viral infectious diseases in the ocean through several plausible mechanisms including carcinogenesis and contaminant-induced immune suppression; and as cofactors for reproductive and clinical failure in marine vertebrates<sup>10</sup>. Furthermore, POPs might cause endocrine disruption and toxicity to all levels of taxonomic groups in mammals and non-mammalian marine species<sup>11</sup>.

Among the POPs, BPA is just the best-documented "bad guy" with a large record of scientific publications documenting its effects. BPA, however, may only represent a microscopic fraction of the real complex mixture image of chemicals involved. Hence, we might only have seen the tip of the iceberg; many more organic chemicals are used in our society for plastic production and many of them can be detected both in the environment, wildlife and humans.



**Figure 2.** Plastic pollution is produced and generated by many sources of chemical compounds, affecting not only the health of marine organisms but potentially interacting at all molecular levels in the trophic chain (Photo art by Allan Jeffs).

The complexity involved with plastic pollution, as it impacts the entire marine ecosystem, results in a partial and sometimes defective picture of the real nature of the contamination. This main issue is magnified by the lack of standardized procedures for plastic quantification on all size ranges and its detection as chemical components associated to plastic itself.

As young scientists based in a developing country, but sharing nevertheless a common interest in environmental microplastic pollution in the oceans, we found it extremely difficult to resolve and establish a general approach to address this global issue especially as research funding is limited. Obviously this may be a common and global dilemma for most scientific staff, not only in developing countries but also worldwide. We are restricted not only in resources to properly evaluate and characterize the real impact of plastic pollution in our oceans research, but this limitation is intensified by the

lack, once again, of an internationally established procedure.

It seems that science and global concern around plastic pollution are more influenced by social networks. As a result, researchers are rushing to publish faster without focussing on setting the basic guidelines to follow. In other words, they are trying to get a "piece of the pie" and get something published in today's hot topic.

We urge local and international, private and governmental institutions to develop standard protocols that can help to compare results in order to understand the effect of plastic pollution in the marine environment.

## Bibliographic references

1. Cressey, D. Bottles, bags, ropes and toothbrushes: the struggle to track ocean plastics. *Nature* 536, 263–265 (2016).
2. Lebreton, L. et al. Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. *Sci. Rep.* 8, 4666 (2018).
3. Eriksen, M. et al. Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS ONE* 9, e111913 (2014).
4. Tanaka, K. & Takada, H. Microplastic fragments and microbeads in digestive tracts of planktivorous fish from urban coastal waters. *Sci. Rep.* 6, 768 (2016).
5. Laist, D. W. in *link.springer.com* 99–139 (Springer New York, 1997). doi:10.1007/978-1-4613-8486-1\_10
6. Vega Thurber, R. L. et al. Chronic nutrient enrichment increases prevalence and severity of coral disease and bleaching. *Glob Change Biol* 20, 544–554 (2013).
7. Mathieu-Denoncourt, J., Wallace, S. J., de Solla, S. R. & Langlois, V. S. Plasticizer endocrine disruption: Highlighting developmental and reproductive effects in mammals and non-mammalian aquatic species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 219, 74–88 (2015).
8. Christensen, J. H., Glasius, M., Pécseli, M., Platz, J. & Pritzl, G. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in marine fish and blue mussels from southern Greenland. *Chemosphere* 47, 631–638 (2002).
9. Rohwer, F. & Thurber, R. V. Viruses manipulate the marine environment. *Nature* 459, 207–212 (2009).
10. Murphy, S. et al. Reproductive Failure in UK Harbour Porpoises *Phocoena phocoena*: Legacy of Pollutant Exposure? *PLoS ONE* 10, e0131085 (2015).
11. Oehlmann, J., Oetken, M. & Schulte-Oehlmann, U. A critical evaluation of the environmental risk assessment for plasticizers in the freshwater environment in Europe, with special emphasis on bisphenol A and endocrine disruption. *Environmental Research* 108, 140–149 (2008).

## LETTER TO EDITOR / CARTA AL EDITOR

### Inmunoterapia activa en cáncer de pulmón, nuevas opciones terapéuticas. Active immunotherapy in lung cancer, new therapeutic options.

Thelvia I Ramos.

DOI. 10.21931/RB/2018.03.03.2

El tratamiento con anticuerpos monoclonales (del inglés mAb) está siendo cada vez más utilizada como blanco terapéutico novedoso en la oncología clínica. Estos anticuerpos inhiben específicamente las vías de señalización en el crecimiento tumoral provocando una inducción de respuestas inmunológicas contra las células tumorales. Al combinar anticuerpos monoclonales, se pueden redirigir a diversas vías simultáneamente, lo que puede conducir a efectos aditivos o sinérgicos. Teóricamente, los anticuerpos son muy adecuados para su uso en terapia de combinación, debido a la toxicidad de superposición limitada y la falta de interacciones farmacocinéticas<sup>1</sup>.

Los mAb son una modalidad terapéutica eficaz comprobada para la tumorigénesis humana. Varios mAb están aprobados para objetivos críticos en la señalización oncogénica dentro de los tumores y su microambiente lo que ha mejorado significativamente su efectividad. Los avances en cuanto al perfil de expresión génica, la proteómica, la secuenciación profunda y el descifrado de redes de señalización complejas han revelado nuevas dianas terapéuticas donde se han potencializado los mAb<sup>2</sup>.

Existen evidencias de su eficacia en las diversas investigaciones clínicas sobre anticuerpos y sus derivados. Un progreso notable en la inmunología tumoral, incluye trabajos sobre vigilancia inmunológica, blancos antigénicos y puntos de control inmunológico. Una de las áreas terapéuticas más atractivas con el uso de los anticuerpos lo constituye la inmunoterapia inducida activamente, que incluye combinaciones de los mismos en vacunas que pueden inducir respuestas antitumorales, al aprovechar el poder estimulador y desencadenante de una respuesta sostenida del sistema inmunitario<sup>3</sup>. La inmunoterapia inducida activamente es uno de los campos más prometedores en la investigación del cáncer y se están estudiando numerosos enfoques para diseñar vacunas eficaces contra el cáncer<sup>4</sup>. Los objetivos finales de la terapia de vacuna es aprovechar la inducibilidad y especificidad inherentes del sistema inmune para producir memoria activa de larga duración, que a su vez produciría respuestas más rápidas y sólidas a la re-exposición.

Uno de los mAbs estudiados y con aplicaciones clínicas desde aproximadamente 20 años y que propone una inmunoterapia combinatoria, es el Racotumomab-alum o su forma comercial Vaxira<sup>®</sup>, es una vacuna terapéutica para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas. Este producto contiene racotumomab adyuvado a hidróxido de aluminio y constituye una vacuna anti-idiotipo dirigida al gangliósido asociado al tumor NeuGcGM3<sup>5</sup>.

El Racotumomab-alum logra generar una respuesta inmune efectiva contra antígenos asociados a tumores al usar un anticuerpo monoclonal anti-idiotipo (mAb Ab2). El uso de Ab2 como vacuna es una consecuencia de la teoría de red idiótica de Jerne, que postula que, debido a la gran diversidad potencial de las regiones variables de las inmunoglobulinas, el repertorio idiotipo puede imitar el universo de epitopos propios y extraños<sup>6</sup>. Lo que indica que los anticuerpos anti-idiotípicos seleccionados adecuadamente, podrían actuar como sustitutos de antígenos asociados a tumores. Varios enfoques han

sido probados con el objetivo de estimular el sistema inmune para desarrollar una respuesta antitumoral efectiva, en este caso los gangliósidos, en particular NeuGcGM3, es un objetivo atractivo para la inmunoterapia del cáncer, ya que se sobre-expresan en las células tumorales, pero no en las células normales<sup>7</sup>. Un grupo de investigadores japoneses evidenciaron que los gangliósidos que contienen NeuGc se expresan en más del 90% de los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (de sus siglas en inglés Non-small cell lung cancer, NSCLC)<sup>8</sup>.

Uno de los tumores sólidos que más se ha trabajado, en busca de nuevas opciones terapéuticas es el cáncer de pulmón, el cual se considera el más común y la principal causa de muerte relacionada con neoplasias en todo el mundo. A pesar de la amplia investigación clínica en los últimos años, solo el 15,9% de los pacientes con cáncer de pulmón están vivos 5 años o más después del diagnóstico<sup>9</sup>. La doble quimioterapia basada en platino todavía se considera la mejor opción como tratamiento de primera línea y el tiempo medio de supervivencia global con estas combinaciones es de aproximadamente 8 a 11 meses<sup>10</sup>. Se han estudiado y propuesto diversos medicamentos de segunda línea como: docetaxel, pemetrexed y erlotinib, con tasas de respuesta del 7% - 15% y un tiempo de supervivencia medio de 5 - 8 meses<sup>11</sup>. No obstante todavía hay poca orientación sobre la elección de los regímenes más adecuados para pacientes con diferentes características en la práctica clínica.

Hasta hace poco, la experiencia con la terapia de la vacuna en el cáncer de pulmón ha sido desalentadora; sin embargo, ha habido una serie de avances prometedores en la evolución del tratamiento sistémico individualizado para NSCLC avanzado y para el cáncer de pulmón de células pequeñas<sup>12</sup>. El desarrollo de los agentes anticancerosos, especialmente la proliferación de agentes antitumorales dirigidos a moléculas, ha prolongado la sobrevida libre de progresión y la sobrevida general, variables principales de los estudios clínicos para demostrar la eficacia de las nuevas propuestas<sup>13</sup>.

En este número de la revista Bionatura se propone un artículo "Evaluación del Racotumomab para el tratamiento del cáncer de pulmón: meta-análisis de ensayos controlados del CIM", el cual presenta una opción terapéutica novedosa para NSCLC, mostrando una acertada evidencia clínica.

La vacuna está compuesta por un anticuerpo monoclonal de origen murino de isotipo IGI contra el AcM P3, con hidróxido de aluminio como adyuvante. Esta formulación se encarga de inhibir la unión al gangliósido NeuGcGM3, permitiéndola unión y muerte de las células de NSCLC que expresan el antígeno. Esta vacuna podría constituir el régimen de mantenimiento más eficaz para prolongar la sobrevida libre de progresión en estos pacientes.

En la actualidad esta vacuna ya ha sido aprobada y registrada en Cuba y Perú como terapia de mantenimiento para pacientes con NSCLC y se encuentra bajo estudios de eficacia terapéutica en marcha el Reino Unido y China.

La vacunación con Racotumomab-Alum ha demostrado ser segura y altamente inmunogénica en pacientes con me-



lanoma avanzado, mama y cáncer de pulmón. Este producto biotecnológico es efectivo para prolongar la supervivencia general en pacientes con NSCLC. Datos preliminares sugieren una correlación entre la inducción de anticuerpos contra NeuGcGM3 y el aumento de los tiempos de supervivencia de pacientes vacunados. Se requiere que además de explorar la eficacia y la seguridad, tenerse en cuenta las posibles combinaciones con la terapia de mantenimiento y su magnitud y sostenibilidad en el tiempo. Además, se requerirán estudios para determinar la combinación más eficiente con la quimioterapia u otras intervenciones inmunes para prevalecer sobre el tumor inducido inmunosupresión.

Otros anticuerpos se exploran, y están dirigidos a ubicar funciones para amortiguar los puntos de control inhibitorios. Lográndose resultados significativos en varios tipos de cáncer, incluido el melanoma. Estos y otros anticuerpos relacionados continúan siendo investigados en el entorno clínico y preclínico. Nuevas estructuras de anticuerpos que se dirigen a dos o más antígenos también han llegado al uso clínico. Los anticuerpos dirigidos a tumores también pueden conjugarse con agentes quimioterapéuticos o radioterapéuticos, o toxinas catalíticas, como un medio para administrar cargas útiles tóxicas a las células cancerosas<sup>14</sup>.

A pesar de los muchos esfuerzos dedicados a desarrollar terapias antitumorales, las neoplasias siguen siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Exhortamos al área clínica-oncológica que establece las mejores opciones terapéuticas, desde el punto regulatorio a continuar el desarrollo de este producto como un futuro candidato internacional para el cáncer de pulmón. La vacuna Racotumomab-alum ha demostrado un beneficio potencial de supervivencia en la población de NSCLC no seleccionada y continua con su desarrollo clínico.

## Referencias bibliográficas

1. Linda M. Henricks Jan H.M. Schellens; Alwin D.R. Huitema; Jos H. Beijnen. The use of combinations of monoclonal antibodies in clinical oncology. *Cancer treatment review* December 2015 Volume 41, Issue 10, Pages 859–67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.10.008>.
2. Manjari Pandey & Daruka Mahadevan Monoclonal antibodies as therapeutics in human malignancies *Future Oncology* vol. 10, no. 4. Published Online: 23 Apr 2014 <https://doi.org/10.2217/fon.13.197>.
3. Freeman-Keller M1, Goldman J1, Gray J2. Vaccine immunotherapy in lung cancer: Clinical experience and future directions. *Pharmacol Ther.* 2015 Sep;153:1-9. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.05.004. Epub 2015 May 16.
4. Ana M. Vázquez1\*, Ana M. Hernández1, Amparo Macías1, Enrique Montero1, Daniel E. Gómez 2, Daniel F. Alonso2, Mariano R. Gabri 2 and Roberto E. Gómez 3. Racotumomab: an anti-idiotype vaccine related to N-glycolyl-containing gangliosides – preclinical and clinical data. *Frontiers in Oncology* 23 October 2012 doi: 10.3389/fonc.2012.00150.
5. Ana María Hernández,\* Nely Rodríguez,\* Jorge E. González,† Emma Reyes,‡Teresa Rondón,\* Tania Griñán,\* Amparo Macías, Sailyn Alfonso, Ana María Vázquez,\*and Rolando Pérez\*. Anti-NeuGcGM3 Antibodies, Actively Elicited by Idiotypic Vaccination in Nonsmall Cell Lung Cancer Patients, Induce Tumor Cell Death by an Oncosis-Like Mechanism. *J Immunol* 2011; 186:3735-3744; February 2011. doi: 10.4049/jimmunol.1000609
6. Jerne NK. Recent advances in immunology. *Schweiz Rundsch Med Prax.* 1974 Dec 17;63(50):1493-4.

7. Irie, A. and Suzuki, A. (1998) CMP-Neu-Acetylneuraminic Acid Hydroxylase Is Exclusively Inactive in Humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 248, 330-333. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1998.8946>
8. Hayashi, N., Chiba, H., Kuronuma, S., Go, S., Hasegawa, Y., Takahashi, M., et al. (2013) Detection of N-Glycosylated Gangliosides in Non-Small-Cell Lung Cancer Using GMR8 Monoclonal Antibody. *Cancer Science*, 104, 43-47. <http://dx.doi.org/10.1111/cas.12027>
9. Howlander, N., Noone, A., Krapcho, M., et al. (2012) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations) Based on November 2011 SEER Data Submission. National Cancer Institute, Bethesda.
10. Grossi, F., Gridelli, C., Aita, M. and De Marinis, F. (2008) Identifying an Optimum Treatment Strategy for Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 67, 16-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.12.002>
11. Shepherd, F.A., Dancey, J., Ram Lau, R., Mattson, K., Gralla, R., O'Rourke, M., et al. (2000) Prospective Randomized Trial of Docetaxel versus Best Supportive Care in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Previously Treated with Platinum-Based Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 18, 2095-2103.
12. Harper, J., & Sainson, R.C. (2014). Regulation of the anti-tumor immune response by cancer-associated fibroblasts. *Seminars in Cancer Biology* 25, 69–77.
13. González, G., Crombet, T., Neningen, E., Viada, C., and Lage, A. (2007). Therapeutic vaccination with epidermal growth factor (EGF) in advanced lung cancer: analysis of pooled data from three clinical trials. *Hum. Vaccines* 3, 8–13.
14. Janice M Reichert\*. Antibodies to watch in 2015. *mAbs* 7:1, 1–8; January/February 2015; © 2015 Taylor & Francis Group, LLC. <http://dx.doi.org/10.4161/19420862.2015.988944>

## RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

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

## Evaluation of racotumomab for the treatment of lung cancer: meta-analysis of controlled trials of the CIM.

Carmen Viada<sup>1</sup>, Javier Quintero<sup>2</sup>, Javier Ballesteros<sup>3</sup>, Martha Fors<sup>4</sup>, Mayteé Robaina<sup>5</sup>, Mabel Alvarez<sup>1</sup>, Aliuska Frías<sup>1</sup>, Saily Alfonso<sup>6</sup>, Amparo Macías<sup>1</sup>, Maurenis Hernández<sup>1</sup>.

DOI. 10.21931/RB/2018.03.03.3

**Resumen:** Racotumomab es una vacuna terapéutica contra el cáncer enteramente desarrollada en Cuba y licenciada en el país para su uso en pacientes adultos con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) en etapas IIIB/IV. Determinar la efectividad de la vacuna del Racotumomab a través de la técnica de meta-análisis combinado. Se efectuó una búsqueda en PubMed de "Racotumomab", "Vaxira", "vacuna anti-idiotípica", se obtuvieron 20 artículos publicados por autores cubanos entre el 1 de enero de 1997 y el 30 de septiembre del 2017, donde se describen los resultados de los estudios clínicos realizados durante el desarrollo de Racotumomab, principalmente los publicados por investigadores cubanos en revistas científicas internacionales arbitradas. Los artículos describen siete ensayos clínicos realizados en Cuba de 1997-2017 con Racotumomab; un Fase I con 71 pacientes, dos Fase II con 72 y 176 pacientes respectivamente, dos Fase III con 273 y 378 pacientes respectivamente, un programa de acceso expandido con 200 pacientes y un estudio promovido por el investigador con 19 pacientes. De estos estudios fueron seleccionados según el criterio PRISMA los tres ensayos controlados y aleatorizados. El meta-análisis consistió en la construcción del gráfico de Forest Plot, el análisis de sensibilidad y el análisis acumulado. El meta-análisis arroja resultados favorables a la vacuna Racotumomab con un HR combinado de 0.77. El análisis de sensibilidad revela que el ensayo que más peso tiene fue el EC080 Fase II. El análisis acumulativo indica que el estudio que menos aporta al meta-análisis fue el último incluido.

**Palabras clave:** Racotumomab, cáncer de pulmón de células no pequeñas, tratamiento vacunal, inmunoterapia, vacunas oncológicas.

**Abstract:** Racotumomab is a therapeutic cancer vaccine entirely developed in Cuba and licensed in the country for use in adult patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) in stages IIIB / IV. To determine the effectiveness of the Racotumomab vaccine through the combined meta-analysis technique. A PubMed search was made of "Racotumomab", "Vaxira", "anti-idiotypic vaccine", 20 articles published by Cuban authors were obtained between January 1, 1997 and September 30, 2017, where the results are described of the clinical studies conducted during the development of Racotumomab, mainly those published by Cuban researchers in peer-reviewed international scientific journals. The articles describe seven clinical trials conducted in Cuba from 1997-2017 with Racotumomab; a Phase I with 71 patients, two Phase II with 72 and 176 patients respectively, two Phase III with 273 and 378 patients respectively, an expanded access program with 200 patients and a study promoted by the researcher with 19 patients. Of these studies, three controlled and randomized trials were selected according to the PRISMA criteria. The meta-analysis consisted in the construction of the Forest Plot graphic, the sensitivity analysis and the accumulated analysis. The meta-analysis shows favorable results for the Racotumomab vaccine with a combined HR of 0.77. The sensitivity analysis reveals that the most important trial was the EC080 Phase II. The cumulative analysis indicates that the study that contributes the least to the meta-analysis was the last one included.

**Key words:** Racotumomab, non-small cell lung cancer, vaccinal treatment, immunotherapy, oncological vaccines.

### Introducción

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer. Se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años. En 2012, los cánceres diagnosticados con más frecuencia en el hombre fueron los de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado. En la mujer fueron los de mama, colon y recto, pulmón, cuello

uterino y estómago. Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer son debidas a cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol. El consumo de tabaco es el factor de riesgo más importante, y es la causa de más del 20% de las muertes mundiales por cáncer en general, y alrededor del 70% de las muertes mundiales por cáncer de pulmón<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Inmunología Molecular, Cuba.

<sup>2</sup> Universidad de La Habana, Cuba.

<sup>3</sup> Universidad del País Vasco, España.

<sup>4</sup> Universidad de las Américas, Ecuador.

<sup>5</sup> Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos, Cuba.

<sup>6</sup> Hospital Celestino Hernández Robao, Cuba.

Los cánceres causados por infecciones víricas, tales como las infecciones por virus de las hepatitis B (VHB) y C (VHC) o por papiloma virus humanos (PVH), son responsables de hasta un 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios. Más del 60% de los nuevos casos anuales totales del mundo se producen en África, Asia, América Central y Sudamérica. Estas regiones representan el 70% de las muertes por cáncer en el mundo. Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas.

Las estadísticas del cáncer de pulmón incluyen tanto al cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) como al cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). El CPCNP es el tipo más frecuente de cáncer de pulmón. Se estima que este año se diagnosticará cáncer de pulmón a 221,200 adultos (115,610 hombres y 105,590 mujeres) en los Estados Unidos. El cáncer de pulmón es el segundo tipo de cáncer más frecuente y la principal causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres. Se estima que este año se producirán 158,040 muertes (86,380 hombres y 71,660 mujeres) a causa de esta enfermedad<sup>1</sup>.

La tasa de supervivencia de un año es el porcentaje de personas que sobrevive al menos un año una vez detectado el cáncer. Para todas las personas que tienen cáncer de pulmón, la tasa de supervivencia de un año es del 44 %. La tasa de supervivencia a cinco años es del 17 %. Las tasas de supervivencia dependen de varios factores, el subtipo de cáncer de pulmón y el estadio de la enfermedad.

Del 15 % de los cánceres de pulmón detectados en la etapa inicial (estadios I a III), la tasa de supervivencia de cinco años es del 54 %. Si el cáncer se ha diseminado a una parte distante del cuerpo (estadio IV), que es el estadio más tardío, la tasa de supervivencia de cinco años es del 4 %.

El cáncer de pulmón representa el 13 % de todos los diagnósticos de cáncer y el 27 % de todas las muertes por cáncer. En los hombres, las tasas de mortalidad han disminuido de forma constante durante las últimas dos décadas, recientemente a una tasa de alrededor del 2.9 % cada año. Las tasas de mortalidad para las mujeres con cáncer de pulmón han disminuido un 1.9 % por año. Por razones poco claras, la mayor incidencia y las menores tasas de supervivencia para el cáncer de pulmón se registran en los hombres de raza negra<sup>1</sup>.

Al concluir el año 2012, el cáncer pasó a ser la primera causa de muerte en Cuba, desplazando a las enfermedades cardiovasculares, pasando a ser una de las problemáticas más complejas a enfrentar por el sistema de salud pública en el país<sup>2-3</sup>.

Datos del Anuario Estadístico de Salud 2013 muestran que en el 2010, de acuerdo a su incidencia, se registraba el cáncer de piel como la primera causa de muerte para ambos sexos, seguido del cáncer de pulmón para hombres y el de mama para las mujeres. En tercer lugar, se ubicaba el cáncer de próstata para el sexo masculino y el de pulmón para las féminas. El cáncer de la cavidad bucal, en los hombres, y el de cuello uterino, en la mujer, registraban el cuarto puesto, en tanto el de colon era el quinto tipo de cáncer en cuanto a incidencia para ambos sexos<sup>4-5</sup>.

Asimismo, al cierre del 2013 la primera causa de mortalidad por cáncer correspondió al de pulmón, tanto para hombres como para mujeres. El segundo puesto lo ocupó el de próstata y el de mama, respectivamente; seguido del cáncer de colon para ambos sexos. El cáncer de laringe ocupaba el cuarto puesto en el sexo masculino, y en la mujer el cáncer en otras partes del cuerpo uterino. En el quinto sitio se encontraba el de esófago para hombres y el de cuello uterino en las mujeres<sup>6</sup>.

## Mecanismo de Acción del Racotumomab

Anticuerpo monoclonal de origen murino de isotipo IG1 generado contra el AcM P33, adsorbido en gel de hidróxido de aluminio como adyuvante<sup>7</sup>. Racotumomab reconoce al AcM P3 e inhibe específicamente la unión al gangliósido (NeugcGM3) que es un antígeno tumor específico que se encuentra expresado en distintos tipos de células tumorales como pulmón, mama y melanoma<sup>8</sup>.

Numerosos estudios preclínicos han evaluado los mecanismos de acción de Racotumomab (Fase 0)<sup>5</sup>. Es un agente inmuno-estimulante contra antígenos tumorales del cáncer de pulmón de células no pequeñas, en particular del gangliósido (NeugcGM3). Induciendo una respuesta inmunológica específica humoral y celular contra el gangliósido (NeugcGM3) provocando la muerte de células tumorales<sup>9</sup>.

1E10 (cuya función es anti-NeugcGM3, denominado posteriormente Racotumomab) es un anticuerpo monoclonal específico contra el antígeno frecuentemente expresado en diversas líneas tumorales de melanoma, mama y pulmón (NeugcGM3). Estos anticuerpos no se expresan naturalmente en seres humanos. Producen la muerte celular de las células que expresan el antígeno en superficie por un mecanismo diferente a la activación del complemento, el mecanismo es diferente a la inducción de apoptosis (independiente de la temperatura, no hay condensación de cromatina, ni se detectó activación de Caspasa 3). Involucra la reorganización del cito-esqueleto, edema celular, lesiones en la membrana celular, con pérdida de citoplasma y desintegración de la membrana plasmática. Lo cual es semejante al proceso de necrosis oncocítica<sup>10-11</sup>.

Racotumomab es una vacuna del CIM para el tratamiento de cáncer de pulmón. Para su aprobación se hace necesaria una fase de experimentación en la que se evalúan los efectos de los tratamientos usuales. Para ello se hace necesario primeramente un proceso de selección de los ensayos clínicos que se realiza según el criterio PRISMA<sup>12-14</sup>.

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

## Materiales y métodos

En la Medicina, meta-análisis es el estudio basado en la integración estructurada y sistemática de la información obtenida en diferentes ensayos clínicos, sobre un problema de salud determinado. Consiste en identificar y revisar los estudios controlados sobre un determinado problema, con el fin de dar una estimación cuantitativa sintética de todos los estudios disponibles. Dado que incluye un número mayor de observaciones, un meta-análisis tiene un poder estadístico superior al de los ensayos clínicos que incluye<sup>12-14</sup>.

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

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

Ensayos Código en RPCEC	Diseño	Dosis	N Racotumomab /Racotumomab/1E10	N Placebo/ Combinación/ Docetaxel/BSC	Referencia
<b>Estudio compasional.</b>	Fase I en CPCNP	1 mg	71	0	Cancer Biology and Therapy. 2007; 6: 12, 1847-1852.
<b>IIC RD-EC071 RPCEC00000010</b>	Fase II en CPCP	1 mg	36	36	Cancer Biology and Therapy. 2007; 6: 145-150.
<b>IIC RD-EC080 RPCEC00000009</b>	Fase II-III en CPCNP	1 mg	89	87	ESMO 2012; Abstract 1472. CCR, May 1, 2014
<b>PUCE106</b>	Programa de acceso expandido en CPCNP	1 mg	100	100 Nimotuzumab +1E10	IJCM 4: 9, 2013 VacciMonitor 2013;22(1):10-14
<b>PL010 VQV</b>	Estudio Exploratorio en CPCNP	1 mg	10	9	No Publicado
<b>IIC RD-EC147 RANIDO RPCEC00000179</b>	Fase III en CPCNP	1 mg	195	105 Docetaxel	ASCO, Jun 1, 2014 ESMO 2016. 1093P.
<b>Multinacional EC-AR-1E10-MAB-301</b>	Fase III en CPCNP	1 mg	188	189 BSC	No Publicado

**Tabla 1.** Ensayos clínicos realizados en Cuba con la vacuna terapéutica Racotumomab, 1997–2017 Ensayos.

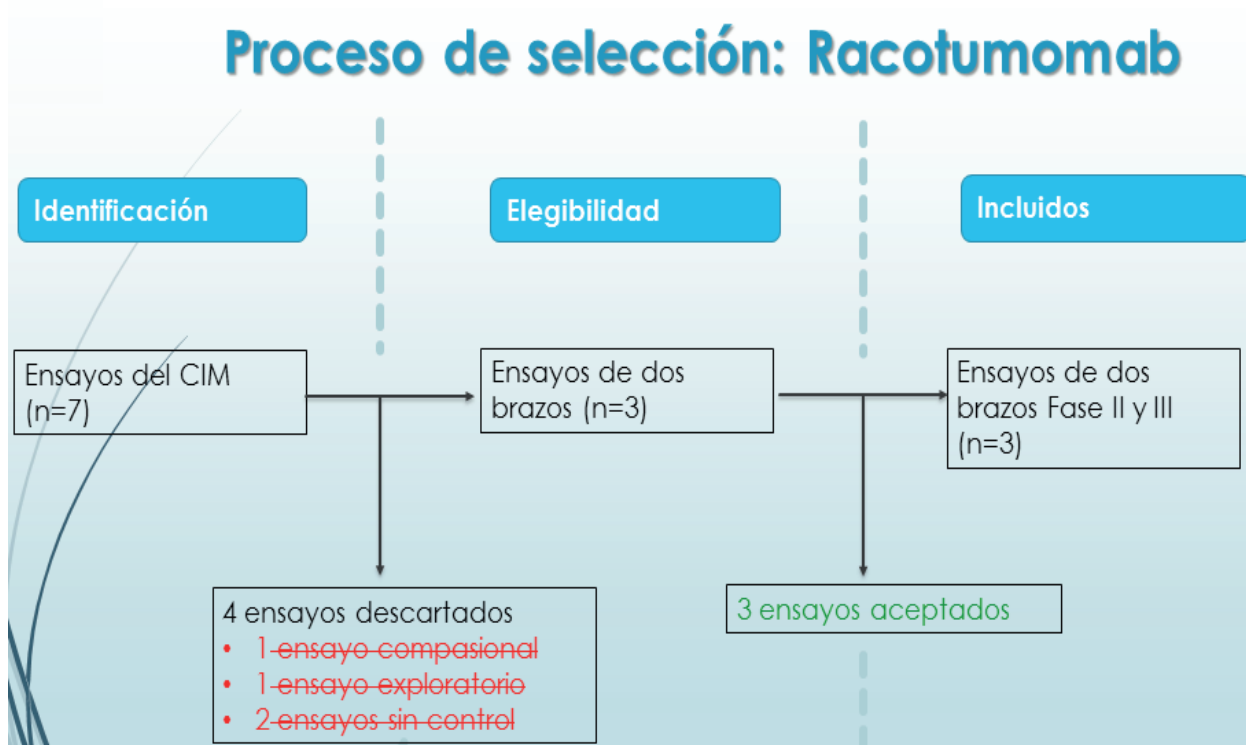
Leyenda: RPCEC: Registro Público Cubano de Ensayos Clínicos

BSC: Mejor Terapia Soporte

CPCNP: Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas

CPCP: Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas

Esquema de Vacunación de Racotumomab: Intradérmica con 15 dosis totales: 5 de la fase de inducción cada 14 días y 10 de mantenimiento cada 28 días y con 5 mg/ml de Alúmina



**Figura 1.** Proceso de selección de los estudios con la vacuna Racotumomab.

En la Tabla 1 se dispone de 7 ensayos clínicos, de estos se rechazan 4: uno por ser en CPCP, otro por ser un estudio exploratorio promovido por el investigador, 2 por ser ensayos no controlados. Este proceso es rectorado por los criterios PRISMA que pueden ser consultados en Ellis, ver Figura 1<sup>14</sup>. Se incluyen finalmente 3 ensayos controlados: EC080 Fase II, EC147 Fase III, EC301 Fase III. En la Tabla 2 se resume el tamaño de cada uno de los ensayos, y la proporción de población dentro del meta-análisis. Al final se obtiene que: el tamaño de la población total en estos tres ensayos es de (21.3%, 33.0%; 45.7%) de 827 pacientes<sup>15-22</sup>. Otros estudios fueron hechos en Argentina, los cuales reportan resultados similares en cuanto a la eficacia<sup>23-24</sup>. Previamente, se evaluó la seguridad del Racotumomab en diferentes localizaciones y resultó ser una vacuna segura. El ensayo Fase II se realizó para pacientes no progresores. El ensayo Fase III fue estratificado para pacientes progresores y no progresores. El ensayo Multinacional también incluyó de los dos tipos de pacientes. Para este trabajo hemos incluido solo los pacientes no progresores de los tres estudios seleccionados<sup>25</sup>.

Ensayo	Racotumomab n (%)	Placebo/BSC n (%)	Docetaxel n (%)	Total
EC080 Fase II	87 (19.2%)	89 (31.9%)	0 (0.0%)	176 (21.3%)
EC147 Fase III	178 (39.3%)	0 (0.0%)	95 (100%)	273 (33.0%)
EC301 Fase III	188 (41.5%)	190 (68.1%)	0 (0.0%)	378 (45.7%)
<b>Total</b>	<b>453 (100%)</b>	<b>279 (100%)</b>	<b>95 (100%)</b>	<b>827 (100%)</b>

Tabla 2. Población incluida.

Se seleccionó para evaluar el tamaño del efecto, el Hazard Ratio (HR), sugerido por Ballesteros para este tipo de datos (tiempo hasta el evento)<sup>12</sup>. En la Tabla 3 se resumen los tamaños de efecto obtenidos, así como su error estándar, datos estos necesarios para la implementación del meta-análisis.

Ensayo	HR	esHR
EC080	0.63	0.101
EC147	0.84	0.161
EC301	0.92	0.111

Tabla 3. HR y error estándar.

## Resultados y discusión

En esta sección se resumirán los resultados obtenidos de la aplicación de los modelos para la vacuna Racotumomab, y posteriormente se unirán buscando el tamaño de efecto combinado. Para realizar el meta-análisis se utilizó el software Review Manager 5 Versión 5.3 y los métodos planteados en. Se asume el modelo de efectos fijos, pues se dispone de los datos individuales de cada ensayo<sup>12-14</sup>.

En la Figura 2 se muestran los resultados de HR y su intervalo de confianza del 95%. Hay dos indicadores de que el efecto combinado es favorable a la vacuna: el p-valor, que se

encuentra por debajo de 0.05, y el z-valor, que es mayor en módulo que 1.96 que es el valor crítico de admisión, o sea el valor que marca la región donde el efecto no es significativo. Se muestran los resultados del Forest Plot, de la prueba de heterogeneidad el valor de I<sup>2</sup> y su intervalo de confianza que corrobora los resultados anteriores. Los tres estudios seleccionados tienen bajo riesgo de sesgo, porque son controlados.

El ensayo de mayor peso 45.0% es el EC080, por la consistencia de los datos. Se chequeó la heterogeneidad según los criterios Cochrane [11]. Se puede concluir parcialmente que el efecto es favorable a la vacuna Racotumomab, pues el diamante (que representa el efecto combinado y sus intervalos de confianza) no atraviesa la hipótesis nula.

En la Figura 3 se muestra el análisis de sensibilidad, necesario para revelar cuál es el estudio más discordante. En la misma aparece el HR y su intervalo de confianza al 95% omitiendo cada uno de los ensayos, así como la estimación combinada de todos los estudios a la vez. Se presentan los resultados del Forest Plot que corrobora los resultados anteriores.

En esta salida de Review Manager 5 Versión 5.3 es posible observar que el estudio que más difiere de los demás es el EC080, pues cuando es omitido el desciende a 0%.

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

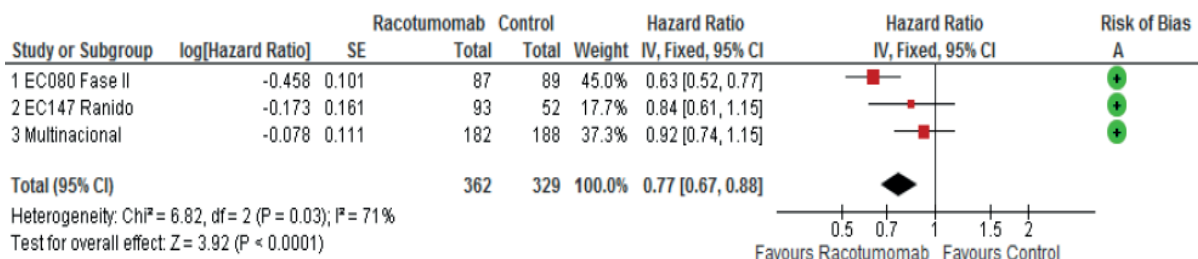
En la salida de Review Manager 5 Versión 5.3 es posible observar que el estudio que más difiere de los demás es el Multinacional, pues cuando se añade este ensayo el asciende desde 0%.

## Conclusiones

El meta-análisis combinando los resultados de varios ensayos clínicos arroja resultados favorables a la vacuna Racotumomab, con un HR de 0.77. El análisis de sensibilidad revela que el ensayo que más peso tiene en estos resultados fue el EC080 Fase II. El análisis acumulativo refleja que el estudio que menos aporta al meta-análisis fue el último incluido.

## Recomendaciones

Los autores sugieren repetir el meta-análisis incluyendo los nuevos ensayos que se vayan terminando para aumentar poder estadístico al estudio. Se debe predecir el tamaño del efecto de los nuevos ensayos a partir de los resultados obtenidos en los estudios previos.



### Risk of bias legend

(A) Allocation concealment (selection bias)

Figura 2. Forest plot para el modelo de efectos fijos.

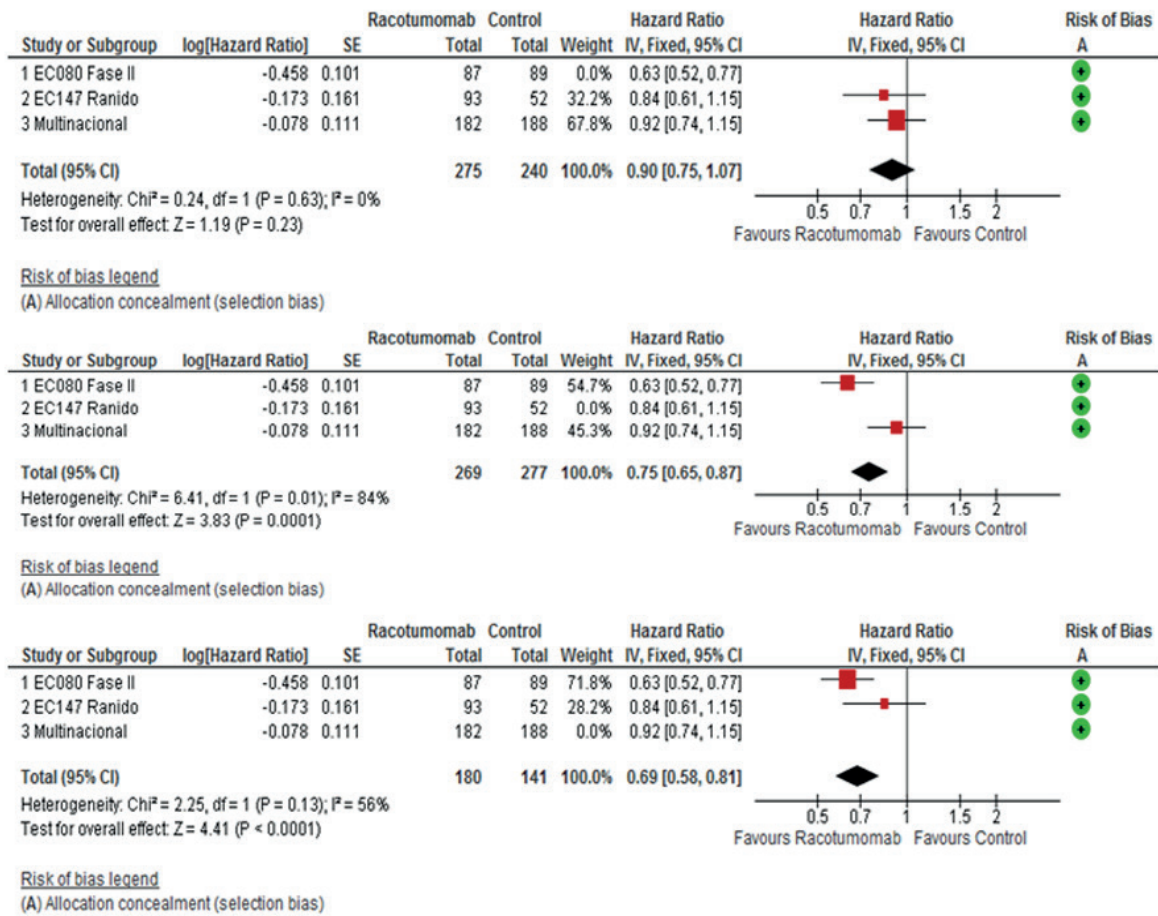


Figura 3. Análisis de Sensibilidad de Racotumomab.

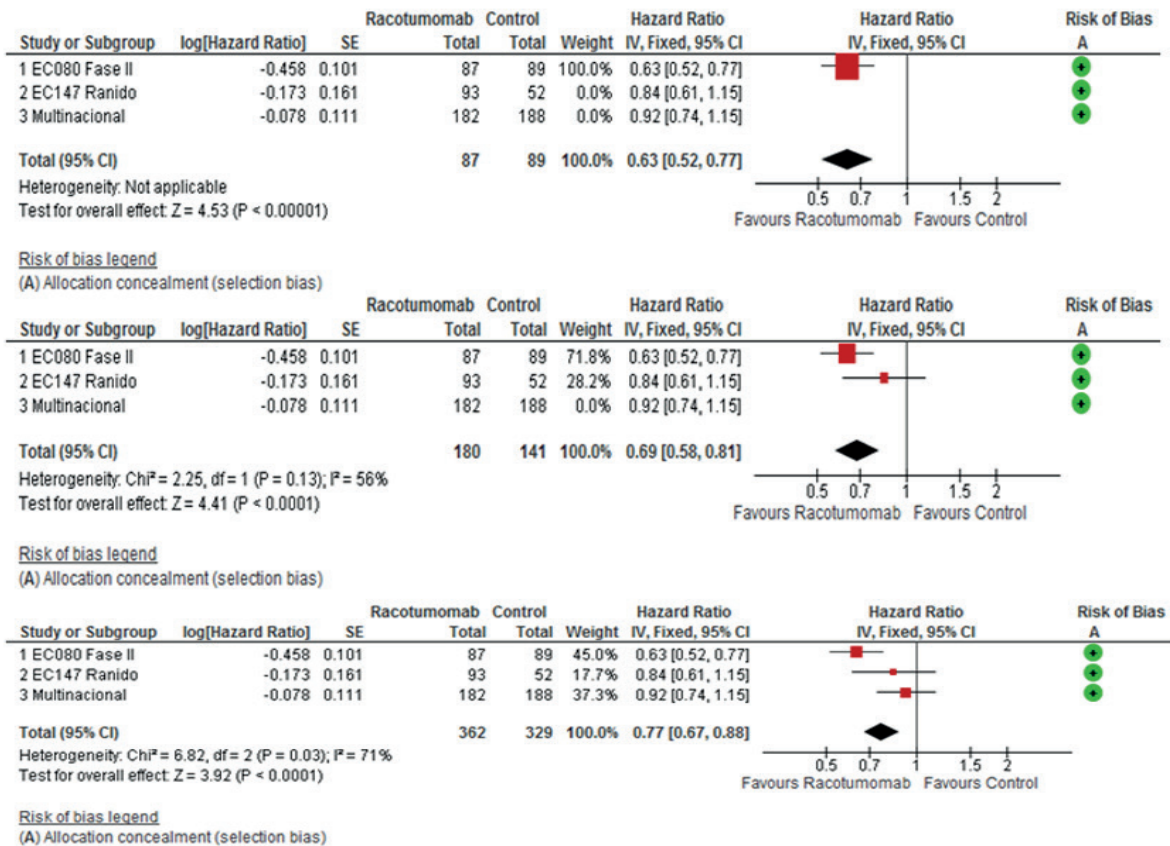


Figura 4. Análisis Acumulativo de Racotumomab.

## Referencias bibliográficas

1. GLOCAN 2012. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide 2012. Lung Cancer <http://globocan.iarc.fr/old/Fact-Sheets/cancers/lung-new.asp>
2. Galán Y, Fernández L, Torres P, García M. Trends in Cuba's Cancer Incidence (1990 to 2003) and Mortality (1990 to 2007). *MEDICC Review*. 2009;11(3):19-26.
3. Romero T. Changing the Paradigm of Cancer Control in Cuba. *ME-DICC Review*. 2009;11(3):5-7.
4. Lage A, Pérez R, Fernández LE. Therapeutic cancer vaccines: at midway between immunology and pharmacology. *Curr Cancer Drug Targets*. 2005 Dec;5(8):611-27.
5. Lage A. Connecting immunology research to public health: Cuban biotechnology. *Nature Immunology*. 2008;9(2):109-12.
6. Lage A. Transforming Cancer Indicators Begs Bold New Strategies from Biotechnology. *MEDICC Review*. 2009;11(3):8-12.
7. Talavera A., Eriksson A. et al. Crystal Structure of an anti-ganglioside antibody, and modelling of the functional mimicry of its NeuGc-GM3 antigen by an anti-idiotypic antibody. *Molecular Immunology* 46 (2009) 3466-3475.
8. Fernández Luis, Alonso Daniel et al. Ganglioside-based vaccines and anti-idiotypic antibodies for active immunotherapy against cancer. *Expert Rev Vaccines* 2 (6), 2003
9. Vázquez A., Hernández A., Gómez D., Alonso D. et al. Racotumomab: an anti-idiotypic vaccine related to N-glycolyl-containing gangliosides- preclinical and clinical data. Review Article. *Frontiers in Oncology* October 2012 Vol 2 Art 150: 1-4
10. Hernández A.M., Rodríguez N., González J.E., Reyes E., Rondon T., Griñán T., et al. Anti-NeuGcGM3 Antibodies, Actively Elicited by Idiotype Vaccination in Non-small Cell Lung Cancer Patients, Induce Tumor Cell Death by an Oncosis-Like Mechanism. *Journal of Immunology* 2011; 186: 3735-3744
11. Hernández AM, Vázquez AM. *Expert Rev Vaccines*. 2015 Jan;14(1):9-20. doi: 10.1586/14760584.2015.984691. Epub 2014 Nov 25.
12. Ballesteros J. Revisiones sistemáticas y meta-análisis de ensayos clínicos. UPV/EHU. Material de Conferencia. Habana. 2015.
13. Borenstein M. et al. Introduction to Meta-analysis. Wiley. UK. 2009
14. Ellis. P. The Essential Guide to Effect Sizes. Cambridge University Press. UK. 2010.
15. Alfonso S., Díaz R.M., de la Torre A., Santiesteban E., Aguirre F., Perez K., et al. 1E10 Anti-Idiotypic Vaccine in Non-Small Cell Lung Cancer Experience in Stage IIIb/IV Patients. *Cancer Biology and Therapy* 2007 December; 6:12, 1847-1852.
16. Neningen E., Díaz R.M., Torre de la A., Rives R., Díaz A., Saurez G., et al. Active Immunotherapy with 1E10 Anti-Idiotypic Vaccine in Patients with Small Cell Lung Cancer. Report of a Phase I Trial. *Cancer Biology and Therapy* 2007. Vol. 6, Issue2, E1-E6.
17. Macías A. Active specific immunotherapy with racotumomab in the treatment of advanced non-small cell lung cancer (nslcl). Poster presentado ESMO meeting 2012; abstract 1472.
18. Alfonso S., Valdés-Zayas A., Santiesteban E., Mendoza I., Guerra P., García, Flores Y., Areces F., Viada C., Ortiz R., de la Torre A., Cepeda M., Pérez K., Chong E., Hernández A., Toledo D., González Z., Mazorra Z., Crombet T., Pérez R., Vázquez A., Macías A., and Hernández M. A randomized, multicenter, placebo-controlled clinical trial of racotumomab-alum vaccine as switch maintenance therapy in advanced non-small-cell-lung cancer patients. *Clinical Cancer Research*, May 1, 2014; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1674.
19. Santiesteban E., Alfonso S., Neningen E., Acosta S., Pérez L., Macías A., Hernández M., Viada C.E., Estévez D., Moreno Y.G. Racotumomab anti-idiotypic vaccine for patients with non-small cell lung cancer. *International Journal of Clinical Medicine*. IJCM VOL 4, No 9, 2013. Accepted 5/08/2013.
20. Pérez L., Estévez D., Gastón Y., Macías A., Viada C.E. Seguridad del Racotumomab en el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas. *VacciMonitor* 2013;22(1):10-14.
21. Hernández M., Santiesteban E., Ortiz R., Neningen E., Acosta S., Amador R., Flores Y., Robina M., Mendoza I., Guerra P., Valdés-Zayas A., Vázquez, A.M., Macías A., Crombet T. RANIDO: A phase III clinical trial of racotumomab-alum or nimotuzumab versus docetaxel in advanced non-small cell lung cancer patients. ASCO, June 1, 2014
22. Hernández M., Neningen E., Ortiz R., Camacho K., Amador R., Bel-lo L., Flores Y., Acosta S., Pichs G., Cala M., Corella M., Jiménez Y., Díaz Y., Viada C., Robina M., Valdes A., Mendoza I., Guerra P., Macías A., Crombet T. ESMO Congress 2016. 1093P - Switch maintenance therapy with racotumomab or nimotuzumab vs docetaxel for NSCLC patients. October, 7-11, 2016. Denmark.
23. Gómez R., Alfonso S. et al. Active Immunotherapy in Patients with Progressive Disease after first line therapy: Racotumomab experience. Sub-Category: Vaccines Category: Developmental Therapeutics-Immunotherapy Meeting: 2013 ASCO Annual Meeting Abstract n° 3086. *Journal of Clinical Oncology* 31, 2013 (suppl; abstr 3086)
24. Gómez R.E., Macías A., Crombet T., Vázquez A.M., Perez R., Ardigo M.L., Lage A.; Laboratorio ELEA, Buenos Aires, Argentina; Center of Molecular Immunology, La Habana, Cuba; Center of Molecular Immunology, La Habana, Cuba; Recombio, Madrid, Spain; Center of Molecular Immunology, Havana, Cuba. A prospective, randomized, multicenter, open label phase III study of active specific immunotherapy with racotumomab plus best support treatment versus best support treatment in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr TPS3123) Publication-only abstracts (abstract number preceded by an "e")
25. Viada C., Fors M., Neningen E., Alfonso S., Santiesteban E., Mendoza I., Guerra P., García E., Pérez L., Macías A., Hernández M., Vázquez A.M. Seguridad de la vacuna anti-idiotípica 1E10 en pacientes con tumores de diversas localizaciones. *Revista Bionatura*. 2015; 1(1):31-43.

**Recibido:** 13 de diciembre 2017

**Aprobado:** 2 de marzo 2018

## RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

### Effect of the intensive exploitation and forest fragmentation in the genetic structure of *P. oleifolius* in the Colombian Central Andes.

#### Genética poblacional de la especie amenazada de pino *Podocarpus oleifolius* D. Don ex Lamb. en bosques de la cordillera central Andina en Colombia.

Juan C Álvarez-díaz<sup>1</sup>, Diego Ospina-Zapata<sup>1</sup>, W. Rojas<sup>2</sup>, M. A Quijano-Abril<sup>1</sup>

DOI. 10.21931/RB/2018.03.03.4

**Abstract:** Demographic expansion in America over the last decades generated a negative impact in the Andean highland forests and species of the Podocarpaceae family. In Colombia, six species of this family have been recorded for the Andes belonging to three principal genera: *Podocarpus*, *Prumnopitys* and *Retrophyllum*. One the most endangered species is *Podocarpus oleifolius*, because the industry attractiveness. The central Andes Mountains constitutes a fragmented forest landscape and populations of *P. oleifolius* have been severely reduced. We hypothesized that forest fragmentation in the Andean Mountains joined with the individuals selective cutting, have been contributed to the lost of individuals and also to the loss of genetic diversity guiding an inbreeding effect in the populations of *P. oleifolius*. We characterized the genetic diversity of *P. oleifolius* and assayed five microsatellites markers previously published in 10 central Andes native populations. This allowed to us to assess the genetic diversity pattern among populations of *P. oleifolius* by measuring the H-W equilibrium, allele richness, genetic distances by FST and population structure. We found evidence of the negative impact of the forest fragmentation in this species, such a homogenous population and observed heterozygosity excess, suggested as a consequence of the selective surviving. We hope these results could be helpful for the development of better conservations programs.

**KeyWords:** *Podocarpus*, Population genetics, Diversity, Conservation.

**Resumen:** Las poblaciones nativas de la familia *Podocarpaceae* en los Andes colombianos han sido severamente reducidas debido a la intensa explotación forestal. En este estudio reportamos el estado de la diversidad genética de las poblaciones nativas de la especie *Podocarpus oleifolius* en El estudio fue realizado la cual es una de las especies más afectadas de esta familia. en diez localidades de la cordillera central Andina en la región de Antioquia. Nuestros resultados exponen que las poblaciones remanentes presentan aislamiento genético y bajo números de individuos. Este estudio sugiere además que la intensiva explotación forestal de este especie ha tenido efectos negativos en la diversidad genética de *P. oleifolius* en los Andes Colombianos.

**Palabras Claves:** *Podocarpus*, Genética de poblaciones, diversidad, Conservación.

### Introduction

The *Podocarpaceae* gymnosperm family is composed by 18 genera distributed from Central America to South America<sup>1, 2</sup>. Nevertheless, the demographic expansion over the last decades has induced to a negative impact in the Andean highland forests, with a species richness decreases in America<sup>3</sup>. In Colombia, six species of this family have been recorded for the Andes and belongs to three principal genera: *Podocarpus*, *Prumnopitys* and *Retrophyllum*<sup>4</sup>. Forest fragmentation and wood exploitation reduced dramatically the Andean population's richness<sup>5</sup>. For the last fifty years *Podocarpus oleifolius* have been one the most Andean exploited species, mainly because of their industry attractiveness<sup>6</sup>, these caused a severe overexploitation for the last century; yielding a reduction of the original population size<sup>7</sup>. In Colombia *P. oleifolius* is considered a threatened species and is reported as vulnerable category in the Alexander Von Humboldt Institute list<sup>8</sup>.

*P. oleifolius* is distributed over the fragmented forests from southern Mexico to the northern Bolivia with an altitudinal distribution between 1800 and 3300 m. In Colombia is widely distributed in the Andean highland forest with an altitudinal range of 2000 to 3200 m, a rainfall ranges from 1000 to 4000

mm per year and a temperature range of 12°C to 18°C. In the Andean Mountains some studies about the ecology and the potential trade of *P. oleifolius* have been reported, however is very limited the knowledge about the population genetic characteristics. Populations genetics studies about of the dispersed Andean species are scarce but some researches have roughly measured the genetic drift and some basic population structures, mainly based on phenotypic traits with a biodiversity management and conservation purposes<sup>9</sup>.

In Colombia some researchers studied the phenology and ecology of *P. oleifolius* for their forest industry importance, some studies and propagation protocols were subsequently published<sup>4, 10</sup>. Although all the Colombian pines species have been exploited as wood resources, the species distributed along the central Andes mountains are the majority *P. oleifolius*, *Prumnopitys montana* and *Retrophyllum rospigliosi*<sup>11</sup>. Mostly in the Antioquia region, the Andean forest is fragmented and thereby the natural populations of *P. oleifolius* have been severely reduced. Some studies reported the distribution and dominance of the natural population in different Colombian regions (Nariño, Cauca, Valle, Quindío, Risaralda and Antioquia)<sup>10</sup>. This results revealed that in the central Andean

<sup>1</sup> Departamento de Investigación y desarrollo, Grupo de Estudios Florísticos, Universidad Católica de Oriente, Sector 3, cra. 46 No. 40B 50, Rionegro, Colombia.

<sup>2</sup> Grupo de Genética Molecular (GENMOL), Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Calle 67 No. 53 – 108, Medellín, Colombia.



mountains preserves some residuary and isolated populations, been a perfect model to research the genetic structure of isolated populations of trees. Regard to the above, current performed studies in the Universidad Católica de Oriente in association with the Environment regional authorities, we located and recorded the remaining natural populations of *P. oleifolius*<sup>12</sup>. Nevertheless the genetic research in the Colombian Andes for conservation porpoises still incipient, probably because of the rugged geography and social issues associated to the conflict.

The above, lead us to hypothesize that the Andean Mountains forest fragmentation combined with a selective cutting of individuals, have been contributed not to the loss of individuals but for the genetic diversity lost, guiding a inbreeding effect in the relict Andean mountains populations of *P. oleifolius*. Our study is one of the few reports that document the effect of the intensive exploitation on the inbreeding and the genetic diversity of a Colombian endemic and threatened tree species. Our main goal was to characterize the genetic diversity of *P. oleifolius* in the central Andes Mountains. We assayed in 10 native populations with five microsatellites previously published for *P. nakaii* 13. Subsequently we used this data to assess the patten of genetic diversity among populations of *P. oleifolius*. Our goals were to assess the allele diversity, identify the genetic population structure and to establish the inbreeding level. Finally, we hope that this data become a useful conservation strategy tool for *P. oleifolius* in Colombia.

## Materials and methods

### Study site

This research was carried out in the central Andes Mountains in Colombia. We sampled a native forest located at 10 places in seven municipalities at the Antioquia department. The ecosystem is characterized for the forest patches landscape, which is interrupted by small municipalities with economical farming activities. The geography is also characterized by a rough mountainous topology with only a few endemics relict's forests. The average elevation is over the 2000 m and temperature range varies from 10°C to 28°C with an annual rainfall ranges from 1600 to 3500 mm<sup>14</sup>.

### Sample collections and DNA isolation

We used 67 individuals of *P. oleifolius* in 10 different locations distributed in seven municipalities of the central Andes. Fresh leaf tissue was acquired in the field, kept and conserved in silica gel for laboratory processing. All samples were recorded with a voucher sample and we assigned an ID according with the HUCO herbarium codification. We made a DNA extraction from all samples using a cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) protocol<sup>15</sup> and verified by a 1.5 % agarose electrophoresis

### DNA amplification and genotyping

We evaluated eight microsatellites in *Podocarpus*, previously reported by Chiang in 2011<sup>13</sup>. Afterward the optimal temperature was calculated by a PCR gradient using a 96-well T100 Thermal cycler (Biorad) with a temperature range from 50°C to 65°C. PCR was performed with 25 µl of reaction mixture containing 20 ng of template DNA, 0.2 µg of reverse and forward primers, 2.5 µl of 1X NH<sub>4</sub> Reaction buffer (16mM

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C and stabilizer) (Bioline) and 1 U of Biolase™ DNA polymerase (Bioline). The PCR program was set at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, a temperature ranges from 50 to 65°C for 30 s, 72°C for 30 s and a final extension of 72°C for 10 min. Amplicons were checked by 1.7% agarose electrophoresis. Positive amplifications were amplified under the same conditions but using forward fluorescent dyes labeled primers (Table1). Capillary fragment electrophoresis of PCR products was scored against an internal size standard (GeneScan™- 600 LIZ®) on an ABI 3130 genetic analyzer, and genotype data was scored using a gene Mapper 5.0 software (Applied Biosystems, CA,

Population Code	Location		Sample size	Herbarium
	Municipality	County		
CHA	EL Carmen de Viboral	Chaverras	10	HUCO (007323)
MB	EL Carmen de Viboral	Morro Bonifacio	9	HUCO (007324)
CA	El retiro	Cantos de Agua	4	HUCO (007324)
CON	Concepción	San Pedro	6	HUCO (007324)
COL	La Unión	Colmenas	5	HUCO (007324)
SPLA	Sonsón	Plaza principal	4	HUCO (007324)
SSF	Sonsón	San Francisco	4	HUCO (007324)
DES	El Peñol	Despensas	9	HUCO (007324)
IS	El Peñol	Isla del sol	8	HUCO (007324)
LC	Concepción	La Concha	7	HUCO (007324)

**Table 1.** Localities and municipalities across the central Andes sampled for *P. oleifolius*.

USA).

### Statistical analysis

To analyze the *Podocarpus* population genetic diversity in the central Andes Mountains, we used data from five polymorphic microsatellites alleles from different geographic populations located in 10-conserved endemic forest patches. We tested the linkage disequilibrium (LD) between a pairs of loci in each population with a Fisher's exact test in the Arlequin 3.5 software, we also made the Standard diversity indices for each and the total populations<sup>16</sup>. Standard indices included: observed and expected heterozygosity; mean alleles number, allelic richness. We did not excluded null alleles because the small sample, which is due the rarity of tree species in endemic forests. In order to investigate the *P. oleifolius* population structure in the eastern Antioquia, we calculated all the pairwise FST and a standardarized measure G''ST for all pair of populations using the Genodive version 2.0b23 software<sup>17</sup>. We used Bonferroni correction for the test, involving multiple comparisons. Comparing the geographic locations and the genetic structure patterns, we investigate the genetic structure by a Bayesian inference implemented in STRUCTURE version 2.3.2<sup>18</sup>. The number of populations (structures, K) was set to 1 to 10. Optimal number of groups was determined using 20.000 cycles of bur-in period and 60.000 Monte Carlo Chains using as prior information the geographical population composition and an Admixture model, assuming correlation between alleles frequencies in populations. K simulations for each value were repeated 10 times to provide stable and safe estimates probabilities. The optimal number of groups was determined using the Evanno method 19. Molecular variance analysis (AMOVA) was calculated with the Arlequin software version

2.5 16. Diversity index were calculated as the average values of standard indices for genetic diversity using the Alrequin 3.5 software<sup>20-23</sup>.

We also investigated the spatial genetic structure by isolation. We calculated a pairwise matrix using geographical distances in kilometers between the 10 populations sampled. We also calculated the genetic isolation by distance using a Mantel test<sup>24</sup>, employing in the Genodive software with 10.000 permutations. We carried out our analysis using a previously genetic distances matrix with  $F_{ST}$ , calculated in Genodive and grouped by blocks. Allele frequencies graphics were made in the Prism-GraphPad software, version 5 (PrismGraphPad, USA).

## Results

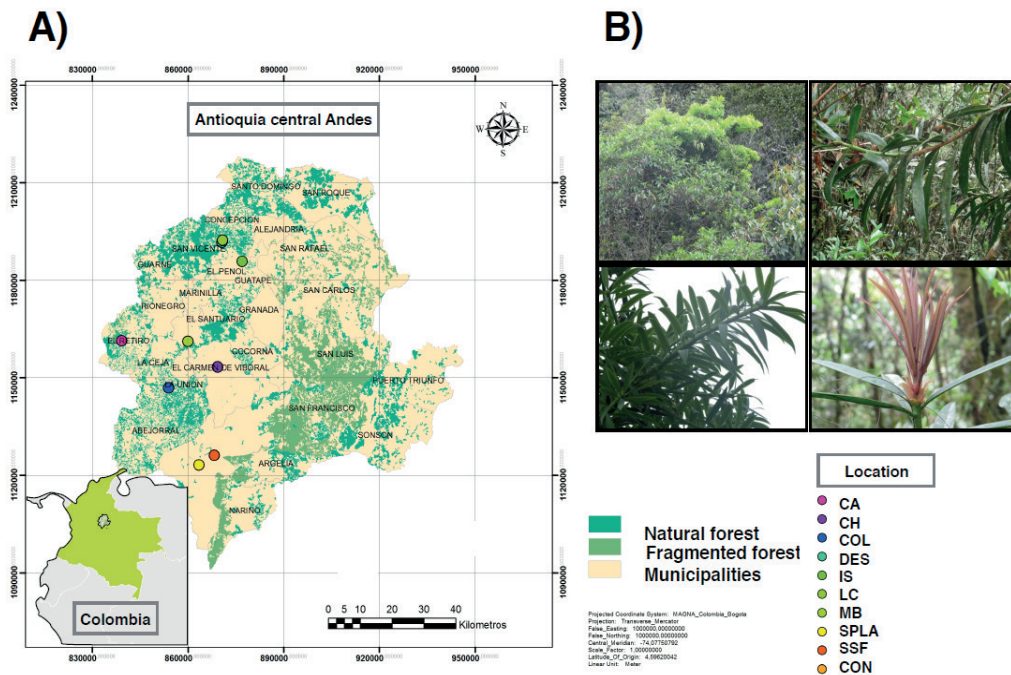
In order to establish the *P. oleifolius* population composition in the central Andean forest in Antioquia, we sampled individuals from 10 places located at seven municipalities. According to the previous reports of the Universidad Católica de Oriente Herbarium (Rionegro, Colombia), *P. oleifolius* could be found in small populations in some endemic forest patches throughout the region. Sampled municipalities and their coordinates locations were coded and consigned at the herbarium HUCO (Table 1). In ArcGis<sup>25</sup>, we made a map of the Antioquia central Andes region and the *P. oleifolius* population distribution. The map shows 10 locations across seven municipalities representing the study area, along with information of the forest coverage in the Central Andes Mountains. This is an evidence of the fragmented forest composition (Fig. 1A). We show some examples of the collected specimens (fig. 1B).

We sampled for genotyping 67 individuals of *P. oleifolius* from 10 populations across the central Andean forests. We used five polymorphic locus reported in *P. nakaii*. We consigned the primer sequences, the microsatellite motive repeats and the optimized conditions for PCR amplification (Table 2). We identified 24 alleles in five microsatellite loci and all the

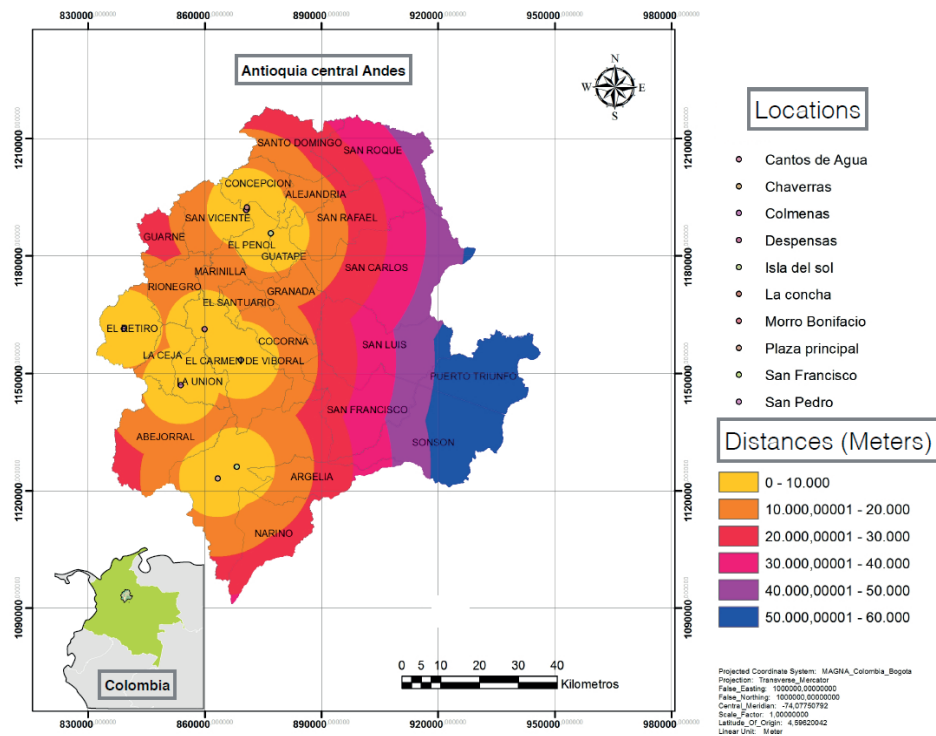
assessed microsatellites were polymorphic. In order to assess the population genetics, we measured the Hardy Weinberg equilibrium, the observed and the expected heterozygosity. All the assessed populations, except the SSF population, showed heterozygosity excess and all the populations did not present H-W equilibrium (Table 3). These results, contrary to our first hypothesis evidence no inbreeding but a selective survival of the individuals related with the heterozygosity excess. Nevertheless, these results have to be looked carefully because of the small number of individuals and the small effective number of reproductive ones.

In order to analyze the allelic richness, we calculated the total alleles number per locus, finding that although in the five loci, there are some representative alleles, and also have some rare alleles in some individuals. The number of alleles per Locus were: Pnh 024 = 4, Pnh 056 = 3, Pnh 177 = 2 and Pnh 188 = 6 (Fig. 2). Subsequently, we evaluate the allelic diversity calculating the standard and the molecular allelic diversity. Calculated standard diversity gave us values ranged from 0.3125 to 0.7778 for the  $H_o$  and values ranged from 0.3125 to 0.5595 for the  $H_e$ . We also calculated the average diversity, finding values ranged from 0.0000 to 0.6601 for the average diversity with high standard deviations values, possibly due to the low number of individuals (Table 4). Although the diversity values were variable, the CA and IS populations shown not molecular diversity, indicating a complete homogeneity.

Genetic differentiation of the *P. oleifolius* populations were calculated using the  $F_{ST}$  and  $G''_{ST}$  estimates. These data were consigned in a matrix showing low differences between tree populations (Table 5). Most of the pairwise comparison shown none difference between populations, indicating a very homogeneous genetic structure. Highest  $F_{ST}$  values observed were between populations CA-COL ( $F_{ST} = 0.1789$ ) and CA-SPLA ( $F_{ST} = 0.1764$ ). Highest  $G''_{ST}$  values were between populations CHA-LC ( $F_{ST} = 0.1640$ ) and CHA-SSF ( $F_{ST} = 0.1764$ ). Distance isolation was assessed calculating a Mantel test, but the results were not significant, indicating



**Figure 1.** Map showing *P. oleifolius* population range distribution across ten sampled municipalities in the central Andes. (A) The map shows in green the natural forest patches and the fragmented ones. (B) Representative photos of foliar material collected and sampled trees of *P. oleifolius*.



**Supplemental figure 1.** Map showing *P. oleifolius* population range distribution across the Antioquia central Andean municipalities and counties. The color represents the distances in meters according to the table (right).

Locus	Primer sequence	Size range (pb)	Repeat motif	T <sub>a</sub> (°C)	Label Dye	GenBank Accession No.
Pnh-024	F: AGTATTTTCCCCTCGAGC	200-300	(CCCTTCT)3	51°C	TET	FR863573
	R: AACAAACGGCATGGGAAAGT					
Pnh-056	F: TAGTACTGCCCAATGGCT	100-160	(AC)21(AT)4	51°C	HEX	FR863575
	R: TGGAAGCTTGATAACCACATCG					
Pnh-121	F: TTCTCAAGGAGCGATGCCTC	200-250	(TG)20	61°C	TET	FR863577
	R: CCTATCCCTAAGGTACCTTG					
Pnh-177	F: CGAAAAGAGGATAGAGACTCAC	500-600	(AC)4(TAAA) )4	56°C	TET	FR863580
	R: TGTTTGTGGCGGAAACTCC					
Pnh-188	F: GGCAATCATAGGGTTAGGTC	350-400	(AC)29	56°C	6-FAM	FR863581
	R: GGCATGTATGTACTACTGTG					

<sup>A</sup> T<sub>a</sub>: Optimized annealing temperature, **TET**: Tetrachlorofluoresceine, **HEX**: Hexachlorofluorescein, **6-FAM**: 6-carboxyfluorescein

**Table 2.** Primer sequences (forward and reverse) characteristics, amplification temperatures and type of labeling employed.

that there are not a genetic differences caused by geographic isolation (data not shown). In order to assess the possible genetic population structures, we calculated the population assignment with the STRUCTRE software. We obtained the structure analysis results with the delta K criterion using 1 to 10 possible groups and admixture model assumption (Fig. 3). Bayesian clustering suggested the presence of four groups, according to the Evanno method, but all the individuals have

a mixed ancestry. We consistently got the same population structure after 10 independent times.

## Discussion

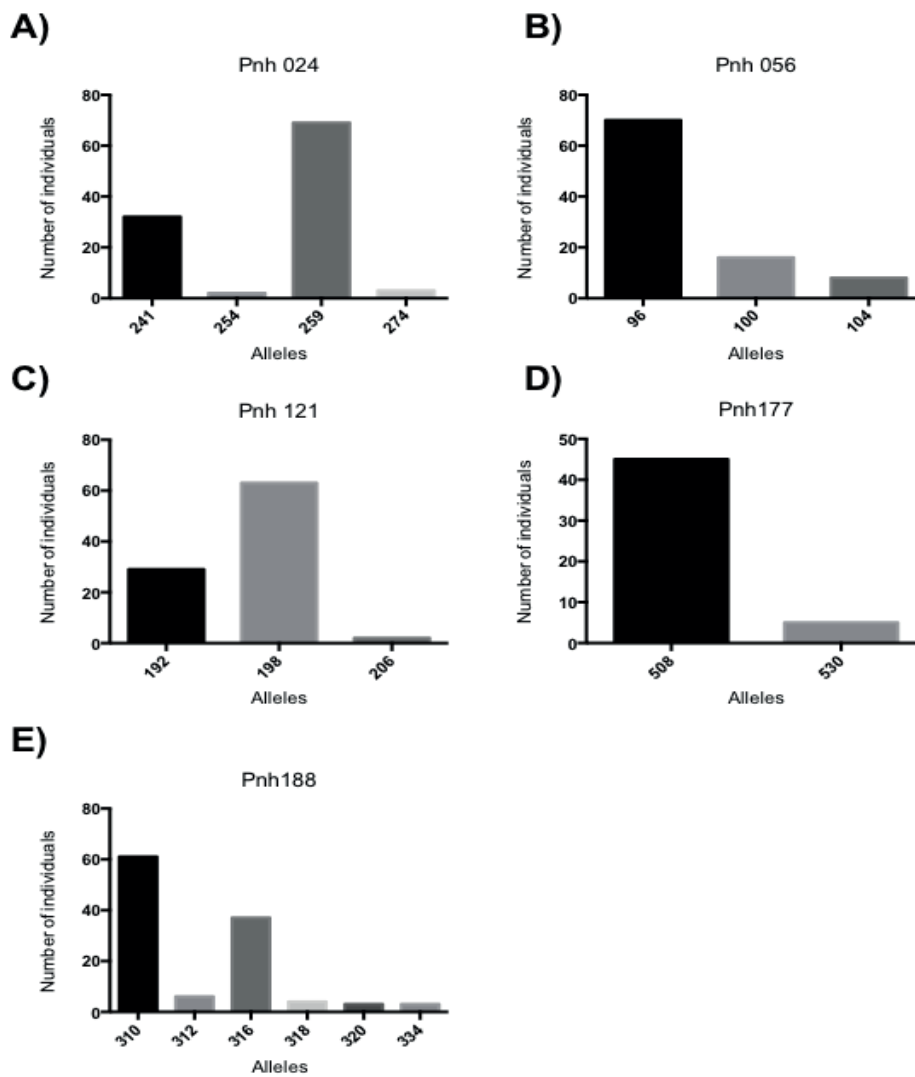
### Forefall exploitation of *P. oleifolius* in Colombia

In Colombia the central Andes mountains landscape is

Population	$N_A$	$A_E$	$H_o$	$H_e$	<i>P-value</i>	d.s
CHA	2.8	2.168	0.7407	0.5290	0.4405	0.0003
MB	3.0	2.031	0.6133	0.4487	0.2619	0.0002
COL	2.3	1.757	0.3600	0.3289	0.3588	0.0002
CON	2.3	1.625	0.4333	0.3628	0.6789	0.0001
CA	2.0	1.795	0.4667	0.3200	0.4799	0.0001
DES	2.3	1.765	0.5778	0.4446	0.6112	0.0000
SPLA	2.3	1.683	0.3500	0.3357	0.6000	0.0000
LC	2.5	1.731	0.4857	0.3895	0.6110	0.0000
SSF	2.0	1.287	0.2500	0.2500	0.8000	0.0000
IS	2.4	1.709	0.4200	0.3570	0.7591	0.0000

<sup>4</sup> $N_A$ : Average allele number,  $A_E$ : Effective number of alleles,  $H_o$ : Observed heterozygosity,  $H_e$ : Expected heterozygosity,  $H_T$ : Total heterozygosity, d.s: Standard deviation. \* P values < 0.05 were considered significant.

**Table 3.** Primer sequences (forward and reverse) characteristics, amplification temperatures and type of labeling employed.



**Figure 2.** Alleles frequencies on assayed loci. Allele count of each microsatellite over sampled populations. A) Pnh 121, B) Pnh 056, C) Pnh 121, D) Pnh 177 and E) Pnh 188.

Population	Standard diversity		Molecular diversity	
	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	Average diversity	d.s
CHA	0.7407	0.5290	0.5053	0.3530
MB	0.6800	0.5154	0.6601	0.5949
COL	0.6000	0.5482	0.5481	0.3957
CON	0.5417	0.4535	0.4141	0.3155
CA	0.7778	0.5333	0.0000	0.0000
DES	0.7222	0.5557	0.5229	0.5124
SPLA	0.5833	0.5595	0.3929	0.3176
LC	0.6071	0.4869	0.5495	0.4279
SSF	0.3125	0.3125	0.2500	0.3539
IS	0.4867	0.4236	0.0000	0.0000

**Table 4.** Genetic diversity in natural *P. oleifolius* populations in the central Andes.

Population	CHA	MB	COL	CON	CA	DES	SPLA	LC	SSF	IS
CHA	-	0.0090	0.0770	0.1390	0.0000	0.1220	0.0000	0.1640	0.1700	0.0370
MB	0.0066	-	0.0220	0.0700	0.0000	0.0000	0.0000	0.0240	0.0590	0.0000
COL	0.0602	0.0544	-	0.1470	0.0000	0.1800	0.0410	0.1480	0.0830	0.0000
CON	0.0701	0.0383	0.0884	-	0.0000	0.0550	0.0000	0.0000	0.0530	0.0000
CA	0.0900	0.0401	0.1789	0.0409	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
DES	0.0716	0.0000	0.1255	0.0482	0.0838	-	0.0000	0.0130	0.0000	0.0000
SPLA	0.0679	0.0000	0.0276	0.0000	0.1764	0.0000	-	0.0000	0.0000	0.0000
LC	0.0849	0.0142	0.0890	0.0000	0.0252	0.0126	0.0000	-	0.065	0.0040
SSF	0.0875	0.0320	0.0513	0.0000	0.1086	0.0011	0.0000	0.0415	-	0.0000
IS	0.0210	0.0000	0.0305	0.0000	0.1170	0.0000	0.0000	0.0027	0.0000	-

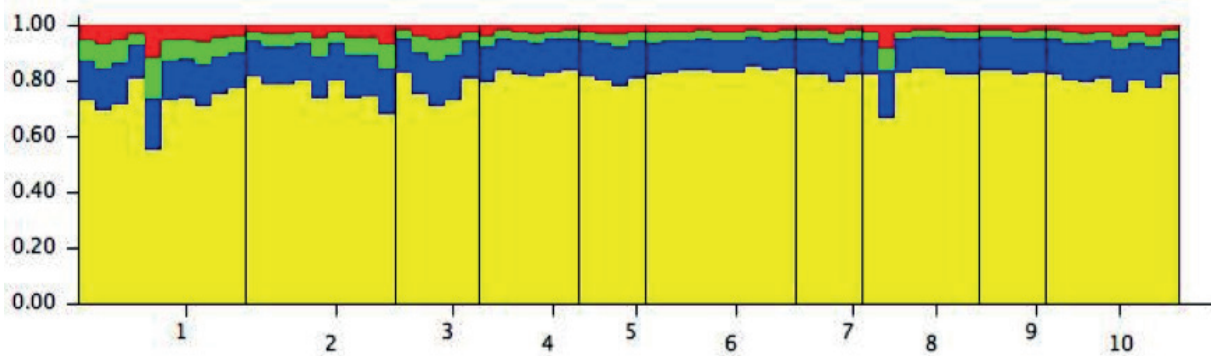
**Table 5.** Pairwise calculation of  $F_{ST}$  (Lower diagonal) and  $G''_{ST}$  (upper diagonal) values for ten natural populations of *P. oleifolius* in central Andes.

composed of vegetal coverage patches such as forest, in which just a minority remain like endemics relicts. Throughout the colonization, many of the native forest species were displaced because of the foreign gymnosperm planting and other non-endemic species, employed mainly for building activities. *P. oleifolius* is one of the six native gymnosperms species in Colombia and is in a threat category. This species was exploited intensively in the second middle of the twenty century, due to their high wood quality, causing a dramatically reduction on the natural populations because of the absence of an appropriate reforestation program. So, native forest fragmentation into the disconnected patches, the continuous individual selection for wood uses and the tree dioic trait, it has leded it to a dramatic reduction of *P. oleifolius*.

Because the industrial uses, some researches have been financed in order to study the phenology and ecology for conservation purposes<sup>5</sup> These investigations resulted in the elaboration of propagation protocols for native populations restoration and expansion, but nowadays the genetic structure is unknown<sup>9</sup>. Regardless of the conservation efforts, because of the demographic expansion and the unknown genetic aspects of *P. oleifolius*, this species is threatened and also included in the IUCN red list<sup>26</sup>.

### Genetic diversity

The current study represents the first attempts to characterize the genetic diversity of an endemic gymnosperm in Colombia, distributed across the central Andes forest. We characterized the genetic diversity of 10 populations of *P. oleifolius* distributed along seven municipalities in the Antioquia central Andes forests. Due to the small numbers of specimens in the native forest, population genetic studies implied some problems but represent an exclusive chance to observe the bottleneck effect on the allelic richness. Andean mountains patches and the disconnected forest structure may be considered analog to an island isolation system for trees species. Hence of the small number of populations, and its dioeciously reproduction, firstly we assumed a low allelic richness diversity. Contrary to our first hypothesis we observed and heterozygosity excess and none H-W equilibrium (Table 3). We also found high values of standard diversity indices, which were ranged from 0.3125 to 0.7778 for the H<sub>o</sub> and from 0.3125 to 0.5595 for the H<sub>e</sub> (Table 4). For average diversity, the values were very variable; we found values from 0.0000 to 0.6601. Data supports the effect of the tree selective cutting and the selective survival of a particular phenotype. The last agrees with field reports, which suggest that most of the observed



**Figure 3.** Plots of theoretical populations of 66 individuals of genotyped *P. oleifolius* trees with five nuclear microsatellites loci and for  $K=4$ . Each line represents a single tree and the colors represent the probabilities to be assigned to one of the four simulated population. Black lines indicate the division between original population groups. Populations are: CHA (1), MB (2), COL (3), CON (4), CA (5), DES (6), SPLA (7), LC (8), SSF (9) and IC (10).

trees remnants have twisted and short trunks. Regarding to the effective alleles number, we found low effective alleles in all fragments, reflecting a population dynamic with a poor genetic flow. This suggests that exist a negative isolation effect caused by a drastic reduction in the number of individuals in a population with some characteristics such as sexual reproduction, which is aggravated by a restricted distribution range.

Based on modern research and the Global plan of action for Conservation, one of the most important aims is to achieve a sustainable use and manage of the forest genetic resources<sup>27</sup>. According to the last, we argue that to establish a genetic structure of threatened species like *P. oleifolius*, will be a valuable approach for new conservation programs. In order to draft the population structure of *P. oleifolius* in the Antioquia central Andes, we calculated the  $F_{ST}$  and  $G''_{ST}$  estimates, which showed null or moderate differences, except for the CHA and MB population, which are the most isolated and also the less disturbed populations (Table 5). Although we calculated a Mantel test, these showed not significant results for genetics differences associated to a geographic isolation (data not shown). Finally, we tried to model a draft of the population structure employing the STRUCTURE software. The last go along with the results of the genetic pairwise distances. Again the CHA and MB populations showed moderate differences beside to the other populations. According to the Evanno test, the most feasible number of genetic cluster was four groups. Although our genetic analysis did not show an evident isolation, which showed low genetic diversity between fragments and a homogeneous structure, which may not be associated to a geographic isolation, but probably due to the anthropogenic conflicts guided by the selection of some particular phenotypes.

#### Phenotypes under selection and concerns for conservations programs

Farming development and the consequent forest fragmentation had enabled a reduction of the suitable habitat for *P. oleifolius*. Wood exploitation not only has reduced the population size but also the genetic diversity. Considering our results, we hypothesize that the massive forestall exploiting was liable for the abrupt population decrease, which consequently constituted a bottleneck. We found in the central Andes forest; that just small populations remain conserved. In rare species like *P. oleifolius* not only exist a small number of individuals but also a smaller number of effective alleles, risking the species fitness and even their survival. A classic population genetics paper published by Nei<sup>28</sup> explained that a bottleneck may not have a necessary reduction in the alleles richness, this is true just if the population reproduction rate is enough to compensate the

allelic loss by genetic drift<sup>28</sup>. Otherwise *P. oleifolius* is a gymnosperm species where its reproduction rate is slow, implying that the bottleneck effect and the subsequent genetic drift might have a drastic and negative effect in the allele richness. We found that some common alleles are in the majority of the populations, but moreover exist some rare alleles that are exclusive for certain populations, which reflect the variable allelic diversity between sampled populations (Table 4). Typically, the outcrossing breeding offset the effects of genetic drifts and geographic isolation preventing allelic loss. Our sampled populations showed an excess of heterozygosity compared with the expected. These indicated that not all the population had low levels of genetic diversity as we firstly thought. Finally, with the aim to make a genetic draft structure of those populations, we calculated the  $F_{ST}$  value, which gave us an idea of the population genetic distances. We did not found correlation between geographic and genetic distances using the Mantel test, but we found that most of the populations were extremely genetically similar. According to most of the population genetic indices, this kind of results, showed highly similar values of  $F_{ST}$  concomitant with heterozygosity excess, suggesting a selective individuals survival. This is in accord with field observations, indicating that because the species wood interest in the region, particular phenotypes have been selected and the less attractive are left.

Asses the genetic consequences of the forest fragmentation in Colombia, should become a major relevant topic in the framework on climate change. For this reason, characterize the genetic diversity in such threatened native species like *P. oleifolius*, not only is important but also imperative. Results constitute to our knowledge, one of the firsts researches that provide evidence of the allelic richness and genetic population structure of *P. oleifolius* in Colombia. Particularly in species with small populations, it is crucial to assess the genetic fitness reduction consequences and the inbreeding effect, that will be helpful to generate effective conservation strategies and sustainable management of the genetic resources<sup>29</sup>. Regarding this, some expert's researches advise that the introduction of foreign individuals in order to increase the allelic richness in the most homogeneous populations might be a way to mitigate the inbreeding negative effect. This research provides evidence of the negative impact in the forest fragmentation, mainly for important Colombian native tree species. We hope this data become a useful conservation strategy tool for the development of better conservation programs.

## Acknowledgements

We thank to Dirección de Investigación y Desarrollo from the Universidad Católica de Oriente for fund and support this research. Also we want to thank to research group of Molecular Genetics (GENMOL) from the Universidad de Antioquia for providing advice and technical resources during the development of this research. The authors declare to have no conflict of interest.

## Bibliographic references

1. De Laubenfels DJ. A taxonomic revision of the genus *Podocarpus*. *Blumea*. 1985;
2. Zannoni TA, Farjon A. World Checklist and Bibliography of Conifers. *Brittonia*. 1999;
3. Calderón E, Galeano G, García N. Libro Rojo de Plantas Fanerógamas de Colombia. Volumen 1: Chrysobalanaceae, Dichapetalaceae y Lecythidaceae. *Neotropica*. 2002;
4. Torres-Romero J. Podocarpaceae. *Flora de Colombia, Monografía N° 5*. 1988. p. 73.
5. Marin V A. Ecología y silvicultura de las podocarpáceas andinas de Colombia. *Smurfit Cartón de Colombia*; 1998.
6. Vélez MA. Ecología y Silvicultura de las Podocarpáceas Andinas de Colombia. *Smurfit Cartón de Colombia S.A.*; 1998.
7. Cogollo A, Velasquez C, Toro JL, García N. Las magnoliáceas, las miristicáceas y las podocarpáceas. 2007. 189-226 p.
8. García N. Las magnoliáceas, las miristicáceas y las podocarpáceas. IAVH, editor. Instituto Alexander von Humboldt; 2007.
9. Rojas A. Pinos Colombianos: Rev el mueble y la madera. 2009;18-25.
10. Marin V A. Observaciones fenológicas y propagación sexual de tres especies de Podocarpaceae de la zona Andina Colombiana. *Cali*; 1995.
11. Calderón-Saenz E. Libro Rojo de plantas de Colombia. Libro rojo de plantas de Colombia. Volumen 6. Orquídeas, Primera parte. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. 2006. 828 p.
12. Gomez S MC, Rodríguez M SL, Quijano A MA. Programa integral de conservación y recuperación para las especies *Podocarpus oleifolius*, *Godoya antioquensis* y *Cariniana pyriformis* en áreas del bosque montano bajo y bosque húmedo tropical del oriente antioqueño. 2009.
13. Chiang YC, Shih HC, Chang LW, Li WR, Lin HY, Ju LP. Isolation of 16 polymorphic microsatellite markers from an endangered and endemic species, *podocarpus nakaii* (podocarpaceae). *Am J Bot*. 2011;98(11):14-7.
14. Alzate F, Idarraga Á, Díaz O, Rodríguez W. *Flora de los bosques montanos de Medellín*. 2013. p12 p.
15. Doyle J., Doyle J. DNA Isolation from Small Amount of Plant Tissue. *Phytochem Bull*. 1991;
16. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010;10:564-7.
17. Meirmans PG, Van Tienderen PH. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol Ecol Notes*. 2004;4:792-4.
18. Pritchard JK. Documentation for structure software : Version 2.2. Available at: <http://pritch.bds.uchicago.edu>. 2007;
19. Earl, Dent A. and vonHoldt BM. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour*. 2012;4(2):359-61.
20. Ewens WJ. The Sampling Theory of Selectively Neutral Alleles. *Theor Popul Biol*. 1972;3:87-112.
21. Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Tempe AZ Arizona State University. 1987.
22. Tajima F. Measurement of DNA polymorphism. *Mech Mol Evol*. 1993;37-59.
23. Zouros E. Mutation rates, population sizes and amounts of elec-

- trophoretic variation of enzyme loci in natural populations. *Genetics*. 1979;92(23):623-46.
24. Mantel N. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Res*. 1967;
  25. ESRI. *ArcGIS Desktop: Release 10*. Redlands, CA: Environmental Systems Research Institute.; 2011.
  26. IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-3. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. 2015.
  27. FAO. Global plan of action for the conservation, sustainable use and development of forest genetic resources. 2014.
  28. Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The Bottleneck Effect and Genetic Variability in Populations. *Evolution* (N Y). 1975;
  29. Newton AC, Allnutt TR, Gillies ACM, Lowe AJ, Ennos RA. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology and Evolution*. 1999.

**Recibido:** 16 June 2018

**Aprobado:** 20 July 2018

## RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

# Efecto del carbón activado en la germinación y brotación in vitro de *Citrus limon* (L.) y su dinámica de crecimiento.

## Effect of activated charcoal on in vitro germination and shoot multiplication of *Citrus limon* (L.) and its growth dynamics.

Ivonne Vaca<sup>1</sup>, Miguel Marulanda<sup>2</sup>, Joana Verdesoto<sup>2</sup>, Alejandro Núñez<sup>2</sup>, Ramiro Daniel Acurio<sup>1</sup>, Viviana Chiluisa-Utreras<sup>1</sup>.

DOI. 10.21931/RB/2018.03.03.5

**Resumen:** Los estudios de cultivo de tejidos en *Citrus limon*, se han enfocado en la influencia de reguladores de crecimiento para su propagación. En la presente investigación se realizó la evaluación de la adición de carbón activado en el medio de cultivo, obteniendo mejores resultados que investigaciones sobre adición de fitoreguladores. El cultivo *in vitro* de *C. limon* en medio Murashige and Skoog (MS) adicionado con carbón activado (1 g.L<sup>-1</sup>), permitió obtener resultados favorables en las variables días a la germinación y brotación. Además, se generó las curvas para las variables germinación (fase de introducción), longitud de tallo, número de brotes por planta, número de hojas por planta y longitud de la hoja (fase de multiplicación), lo que permite seguir su dinámica de crecimiento. Finalmente, se determinó la correlación del incremento del número de brotes y la longitud de tallo.

**Palabras Claves:** carbón activado, curvas de crecimiento, germinación, limón.

**Abstract:** Tissue culture of *Citrus limon* has focused on the influence of growth regulators for their propagation. In the present study, the evaluation of the culture medium supplemented with activated charcoal presented better results than the addition of plant growth regulators. The *in vitro* culture of *C. limon* in Murashige and Skoog (MS) medium added with activated charcoal (1 g.L<sup>-1</sup>), allowed to get favorable results in days after germination and shoot multiplication. In addition, the curves were generated for germination (introduction phase), stem length, number of shoots per plant, number of leaves per plant and leaf length (multiplication phase), these parameters allows to follow the growth dynamics. Finally, the correlation of the increase in the number of shoots and stem length was determined.

**KeyWords:** activated charcoal, growth curves, germination, lemon.

### Introducción

*Citrus limon* (L.), cuyo nombre común es limón o limonero, es un híbrido natural que presenta una gran cantidad de variedades, el fruto tiene diversas aplicaciones, el zumo tiene alto contenido de ácido cítrico y del epicarpo se obtiene la esencia<sup>1</sup>. Recientes trabajos sobre *C. limon*, reportan altos contenidos de compuestos fenólicos en la corteza, que son responsables de las características antioxidantes de la pulpa, también informan que estos compuestos protegen el ADN contra la rotura por efecto de radicales libres y además tiene propiedades antibacterianas<sup>2</sup>. Todas las cualidades del limón, lo convierten en una planta de alto interés científico en diferentes áreas, por lo que el estudio de su propagación y la dinámica de su crecimiento, son un punto clave para facilitar su producción.

La mayoría de estudios de cultivo *in vitro* de limón se han enfocado en reguladores de crecimiento; el presente estudio propone la adición de carbón activado en el cultivo de tejidos, ya que tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, tiene la capacidad de atrapar diferentes tipos de moléculas, sustancias en exceso, entre estos los inhibidores de crecimiento<sup>3</sup>. La capacidad de adsorción se debe a su fina red de poros y su amplia área interna, esto conlleva a favorecer a diferentes procesos de morfogénesis; además, se plantea la posibilidad que el carbón activado pueda ir liberando lentamente alguno de los reactivos adsorbidos<sup>4</sup>, favoreciendo

su respuesta en el cultivo de tejidos.

La dinámica de crecimiento, representado en las curvas de crecimiento reflejan el comportamiento de la planta en un ambiente particular, en relación al tiempo<sup>5</sup>, lo que en el cultivo *in vitro* permite dar seguimiento a las condiciones óptimas del mismo, como respuesta a diferentes factores de evaluación, en este caso las curvas permiten señalar las características de la vitroplanta [IV1] durante la fase de multiplicación.

### Materiales y métodos

#### Desinfección del material vegetal

Para el cultivo *in vitro* de limón se seleccionaron frutos maduros, de los cuales se obtuvo la semilla. Se realizó una desinfección de los explantes con alcohol al 70%, durante 1 minuto, posteriormente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 20% (v/v) más una gota de tween, durante 20 minutos. Se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril previo a la siembra.

#### Evaluación del efecto del carbón activado en el cultivo in vitro

Las semillas ya desinfectadas fueron sembradas en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) suplementado con sa-

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

<sup>2</sup> Universidad Politécnica Salesiana, Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales.



carosa al 3% y un pH de 5,7. En la presente fase se evaluó el efecto del carbón activado en el medio de cultivo ( $1\text{g.L}^{-1}$ ) y su correspondiente testigo (sin carbón activado). Posteriormente los explantes fueron incubados en el cuarto de crecimiento a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante ocho semanas para su evaluación.

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de germinación y número de brotes. Además se determinó los días a la germinación, definidos como los días a la emergencia de la radícula, tomados desde el momento de la siembra, hasta cuando cada tratamiento presentó 50% (primera fecha) y 75% de germinación (segunda fecha). Los datos de cada variable fueron sometidos a un análisis de varianza ADEVA y se realizó la prueba de Duncan al 5%, para los factores en estudio que presentaron diferencias significativas, empleando el software InfoStat. Mediante el seguimiento continuo se desarrolló la curva de germinación de las semillas.

### Curvas de crecimiento durante la fase de multiplicación

Las plántulas obtenidas en la fase de introducción, fueron transferidas a un medio MS suplementado con sucrosa ( $30\text{g.L}^{-1}$ ). Para la siembra en el medio de multiplicación, se eliminaron los cotiledones y radícula, se segmentaron explantes de  $12\text{mm}$  de longitud aproximadamente. Durante la multiplicación se realizó un seguimiento continuo del crecimiento de los explantes provenientes de la siembra con carbón activado, por seis semanas.

Las variables evaluadas para las curvas de crecimiento durante la fase de multiplicación fueron: Longitud del tallo, Promedio de brotes por planta, Número de hojas, Promedio de longitud de las hojas. Se aplicó una regresión logarítmica sobre las variables longitud del tallo y promedio de brotes por planta.

## Materiales y métodos

### Evaluación del efecto del carbón activado en el cultivo in vitro

En la evaluación del efecto del carbón activado en el medio de cultivo, se encontró que para el porcentaje de germinación y días a la germinación ( $p > 0,05$ ) no hay diferencias, mientras que para el número de brotes presenta diferencia significativa ( $p = 0,0013$ ).

### Germinación y brotación

La adición de carbón activado al medio de cultivo resultó en un efecto positivo, para el desarrollo de plantas de *C. limon*. Tanto la germinación como el número de brotes por planta, fueron mayores en el medio de cultivo adicionado con carbón activado, mientras que los días a la germinación disminuyeron (Tabla 1).

Tratamientos		Germinación (%)	Días a la germinación		Número de brotes (#)
Código	Carbón Activado ( $\text{g.L}^{-1}$ )		Fecha 1	Fecha 2	
			50%	75%	
M0	0	92	28	42	$3,3 \pm 0,11\text{ a}$
M1	1	100	24	35	$10 \pm 0,14\text{ b}$

**Tabla 1.** Promedios de germinación, días a la germinación y número de brotes del *C. limón* durante la introducción al cultivo in vitro.

El promedio del número de brotes por planta, fue tres veces mayor en el medio de cultivo adicionado con carbón activado (M1), lo que puede atribuirse a su capacidad de adsor-

ción de sustancias inhibitorias, reguladores de crecimiento o componentes orgánicos, y puede liberar las sustancias de crecimiento previamente adsorbidas por el mismo carbón activado<sup>6</sup>; de esta manera la planta tendrá una fuente a largo plazo del reactivo, favoreciendo su respuesta en el cultivo in vitro. El carbón activado puede adherir en su superficie una gran diversidad de moléculas (capacidad de adsorción) ya que posee una estructura porosa, elevada área superficial y alta concentración de sitios activos<sup>7</sup>. Confirmando los resultados obtenidos en la presente investigación, se encontró mayor elongación de brotes y raíces en presencia de carbón activado, en el cultivo in vitro de *Solanum sessiliflorum* var. *Thais*<sup>8</sup>.

### Curva de germinación

A pesar de no encontrar diferencias significativas en el porcentaje de germinación y los días a la germinación, se puede destacar que los explantes expuestos a Carbón activado (M1) llegaron al 50 y 75% (Fecha 1 y Fecha 2, respectivamente) de germinación varios días antes que el testigo (M0) (Tabla 1).

En M1 (MS+CA) se obtuvo el 100% de germinación a los 42 días (6 semanas), mientras que para M0 (MS) a las 8 semanas llegó cerca del 92% (Figura 1), lo que indica que el carbón activado aceleró el proceso de germinación en las semillas. El carbón activado puede actuar como catalizador de reacciones químicas<sup>7</sup>, favoreciendo por ejemplo los procesos de respiración de la semilla para su germinación. Singh et al.<sup>9</sup>, sugieren que el carbón activado facilita la capacidad de penetración de la testa, favoreciendo el contacto del agua y oxígeno con las células, dando como resultado mayor germinación de las semillas; en *Solanum lycopersicum* y *Vigna radiata*, los tratamientos con carbón activado favorecieron a la germinación, debido a una mejor absorción de dióxido de titanio. Existen reportes positivos en diferentes especies, respecto a la germinación en semillas expuestas a carbón activado, entre ellas *Hyophorbe lagenicaulis*, *Dendrobium nobile*, *Ophrys* sp., *Disa* spp., *Brassica napus*, *Vitis vinifera*; además se indica que el carbón activado favorece en procesos de embriogénesis somática, maduración y germinación, en diferentes sistemas<sup>4</sup>.

### Curvas de crecimiento de la fase de multiplicación

Respecto a la multiplicación a los segmentos de yema sembrados en el medio de multiplicación, se encontró que la longitud del tallo principal incrementó un 77,1%, en seis semanas de evaluación, pasando de  $11,8$  a  $20,9\text{ mm}$  (Figura 2A), de igual manera el número de brotes incrementó en un 56,8% (Figura 2B).

Varios estudios realizados sobre micropropagación en *C. limon* han sido reportados en relación a reguladores de crecimiento, sin embargo el índice de multiplicación no ha superado los 3 brotes/planta en medio MS + BAP ( $2\text{mg.L}^{-1}$ )<sup>10</sup>, contrario al promedio de número de brotes alcanzado en el presente estudio de 4 brotes/planta en 42 días (Figura 2B).

Quoirin, Da Silva, Martins, & De Oliveira<sup>11</sup>, reportan que la adición de carbón activado ( $2\text{g.L}^{-1}$ ) al medio de cultivo (75% sales MS), en la fase de multiplicación de *Acacia mearnsii*, favoreció en la elongación de los brotes y disminuyó la clorosis, resultados similares a los obtenidos en el presente estudio; concuerdan también con la revisión de Thomas<sup>4</sup>, que indica que el algodón (-----) cultivado con carbón activado, favoreció a la brotación y longitud de brotes.

En seis semanas de evaluación el número de hojas incrementó en un 66,7% ( $2,59$  a  $4,32$ ), y la hoja duplicó su longitud, con un crecimiento del 101,2% desde  $5,16$  a  $10,42\text{ mm}$ . Además, se puede resaltar que el número de hojas tuvo su mayor

incremento en las dos primeras semanas, con un promedio de 1,09 hojas. Los resultados de la presente investigación concuerdan con el estudio de *Brassia verrucosa*, que reporta efectos positivos sobre la longitud de hoja, cuando se cultivó en medio de cultivo suplementado con carbón activado y peptona<sup>12</sup>. Además, el crecimiento de la hoja pudo verse favorecido también, por la densidad de siembra (1 planta por contenedor), ya que le provee suficiente espacio al interior del frasco y favorece al paso de la luz.

**Correlación del incremento del número de brotes y la longitud de tallo.**

Después de probar con varios modelos de correlación, se ha establecido que el incremento en el número de brotes en relación a la longitud del tallo es descrito matemáticamente como una función que se ajusta mejor a una regresión logarítmica (Figura 3), con un coeficiente de determinación  $R^2=0,997$ . La ecuación resultante fue  $Y = 5,154\text{Ln}(X) + 11,811$ , donde Y es la longitud del tallo (mm) y Ln(X) el logaritmo natural del número de brotes por planta.

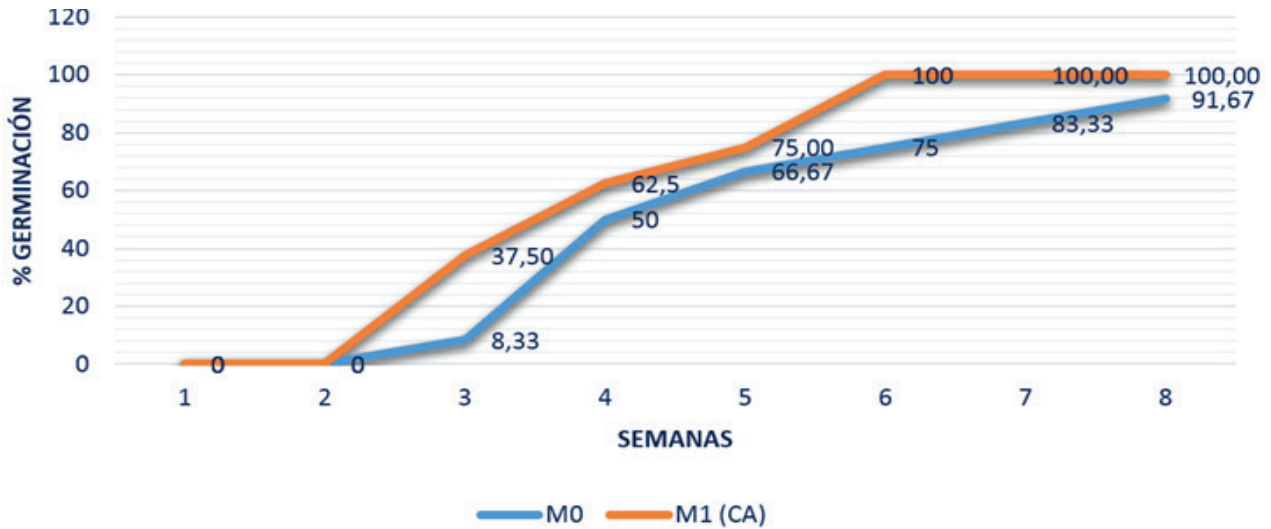


Figura 1. Curva de germinación del *C. limon* durante la introducción al cultivo in vitro.

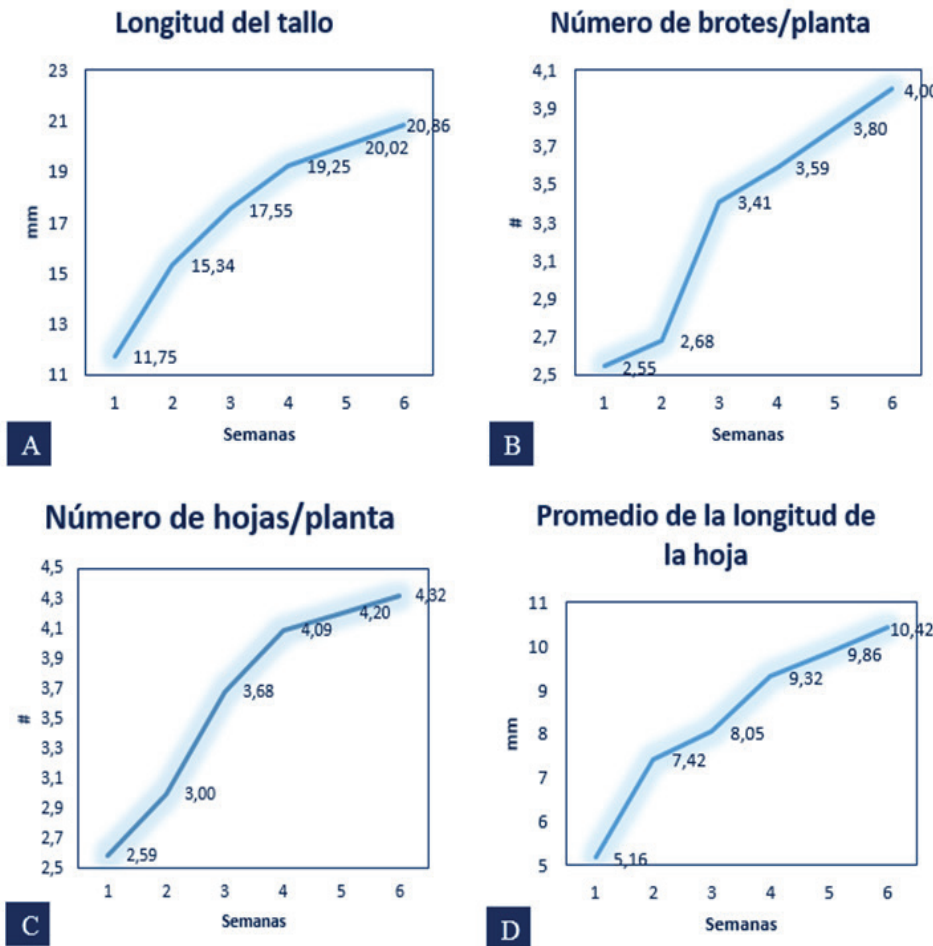
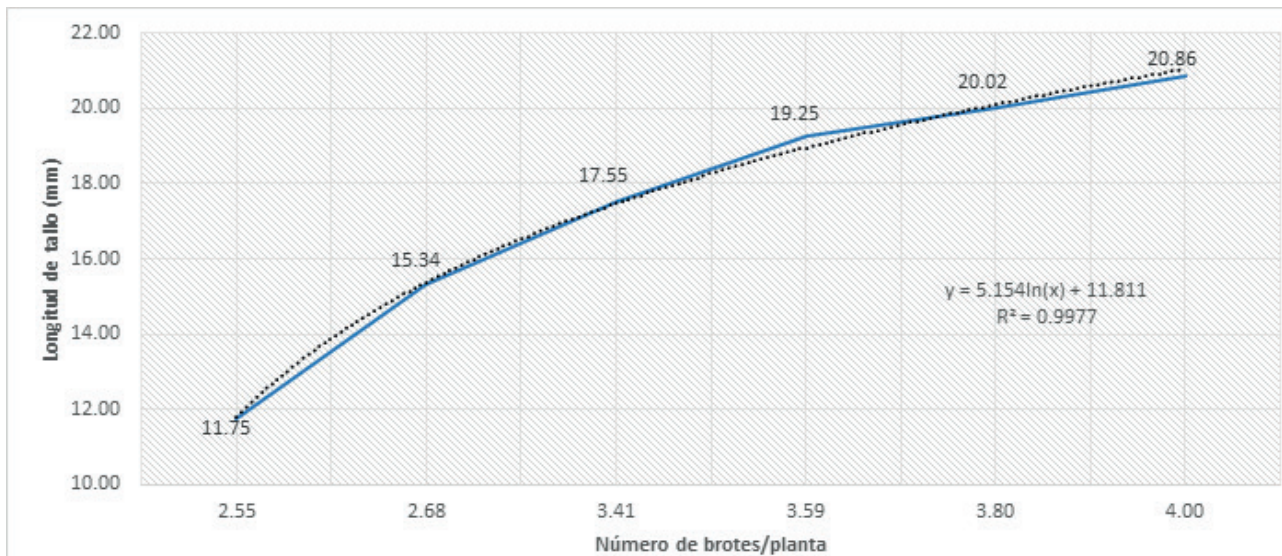


Figura 2. 2A: Curva de crecimiento del promedio de la longitud del tallo de la vitroplanta. 2B: Curva de crecimiento del promedio del número de brotes por planta. 2C: Curva de crecimiento del promedio de número de hojas por planta. 2D: Curva de crecimiento del promedio de la longitud de las hojas.



**Figura 3.** Curva y ecuación de regresión logarítmica (logaritmo natural) entre la longitud del tallo y el número de brotes por planta.

La relación entre el índice de multiplicación representado por el promedio de número de brotes por planta y la longitud del tallo, fue positiva y se ajustó a una curva de regresión logarítmica, misma que sugiere que a mayor longitud del tallo de *C. limon* habrá un mayor número de brotes. Información que concuerda con los datos reportados para *Rubus glaucus*, que a mayor longitud (2,18 cm) se contabilizaron mayor número de brotes (5,27)<sup>13</sup>.

La figura 3 muestra que el incremento en la longitud del tallo fue menor conforme avanzaron las observaciones semanales, empezando con un incremento de 3,59 mm de la primera semana y terminando con 0,84 mm en la última semana; esto relacionado con el número de brotes, permite suponer que los entrenudos fueron cada vez más cortos; lo que favorece al índice de multiplicación, evaluado como el número de yemas (nudos) por planta (14).

## Conclusiones

La adición de carbón activado ( $1g.L^{-1}$ ) en el cultivo *in vitro* de *Citrus limon* permite reducir los días a la germinación e incrementar el número de brotes obtenidos por planta. Las curvas de crecimiento obtenidas permitieron concluir que el mayor incremento de longitud de tallo, número de brotes por planta, número de hojas por planta y longitud de la hoja se da durante las primeras semanas de cultivo. Además se determinó una regresión logarítmica ( $R^2=0,997$ ), para el número de brotes en relación a la longitud del tallo.

## Referencias bibliográficas

- López González A. Guía de los árboles y arbustos de la Península Ibérica y Baleares. 2da ed. España; 2004. 894 p.
- Makni M, Jemai R, Kriaa W, Chtourou Y, Fetoui H. Citrus limon from Tunisia: Phytochemical and Physicochemical Properties and Biological Activities. *BioMed Research International*. 2018;2018(Article ID 6251546):10.
- Weatherhead MA, Burdon J, Henshaw GG. Some Effects of Activated Charcoal as an Additive to Plant Tissue Culture Media. *Z Pflanzenphysiol Bd*. 1978;141-7.
- Thomas D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*. 2008;26:618-31.

- Casierra-Posada F, Cardozo MC. Análisis básico del crecimiento en frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill, cv. 'Quindío') cultivados a campo abierto. *RevFacNalAgrMedellín*. 2009;62:4815-22.
- Polzin F, Sylvestre I, Déchamp E, Ilbert P, Etienne H, Engelmann F. Effect of activated charcoal on multiplication of African yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) nodal segments using a temporary immersion bioreactor (RITA®). *In Vitro CellDevBiol-Plant*. 2014;50:210-6.
- Gómez A, Rincón S, Klose W. Carbón activado de cuesco de palma: Estudio de termogravimetría y estructura. Alemania: Kassel; 2010.
- Almendagna Rodrigues F, Alves R, Pasqual M, Gomes MT, Rezende S. Solidifying agents and activated charcoal for in vitro culture of *Solanum sessiliflorum*. *Pesq agropec bras*, Brasília. 2017;52(11):1123-6.
- Singh P, Singh R, Borthakur A, Srivastava P, Srivastava N, Tiwary D, et al. Effect of nanoscale TiO<sub>2</sub>-activated carbon composite on *Solanum lycopersicum* (L.) and *Vigna radiata* (L.) seeds germination. *Energy, Ecology and Environment*. 2016;1(3):131-40.
- Pérez-Tornero O, Tallón CI, Porras I. An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2010;263-271.
- Quoirin, M, Da Silva M, Martins K, De Oliveira D. Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2001;66:199-205.
- Flores-Escobar G, Gil-Vásquez I, Colinas-León MT, Mata-Rosas M. Propagación in vitro de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman ex. Lindl. *Rev Chapingo SerHortic [Internet]*. 2011;17(1). Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rcsh/v17n1/v17n1a2.pdf>
- Vaca I. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE CULTIVO in vitro DE *Rubus glaucus* (BENTH), MEDIANTE EL USO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO. Congreso presentado en: II Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad - CIBE - ESPOL; 2014; Guayaquil - Ecuador.
- Benavides T, Córdova A. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN in vitro DE *Geranium chilloense* Willd. ex Kunth. Y *Lupinus pubescens* Benth. PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS COMPLETAS, PARA LA PRIMERA ETAPA DE RESTAURACIÓN DE LAS QUEBRADAS DE QUITO [Internet]. [Quito-Ecuador]: UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA; 2015. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/9372>

**Recibido:** 29 mayo 2018

**Aprobado:** 4 agosto 2018

## RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

### Reducción de emisiones de CO y CO<sub>2</sub> al medio ambiente con mezclas B5 y B10 de biodiesel a base de algas (chlorella).

### Eduction of CO and CO<sub>2</sub> emissions to the environment with B5 and B10 mixes of biodiesel based on algae (chlorella).

Carlos Nolasco Mafla Yépez<sup>1</sup>, Ignacio Bayardo Benavides Cevallos<sup>2</sup>, Erik Paúl Hernández Rueda<sup>3</sup>, Edwin Salomón Arroyo Teran<sup>4</sup>, Fernando Renato Ramírez<sup>5</sup>

DOI. 10.21931/RB/2018.03.03.6

**Resumen:** En este artículo se presenta un estudio experimental para evaluar las emisiones de gases contaminantes en un motor usando diésel de origen fósil y mezclas con biodiésel a base de algas al 5 y 10%, denominadas B5 y B10, respectivamente. Los resultados muestran que las emisiones de CO reducen hasta un 8.1% con el uso de B5 y 11% con B10 en todo el rango de revoluciones ensayado, a excepción de 1500 rpm. En el caso de CO<sub>2</sub> se genera un incremento de emisiones con un máximo de 5% usando biocombustible, excepto en ralentí con B5 y a 3000 rpm usando B10. Las emisiones de NOx presentan un incremento elevado a ralentí de 37% usando B5 y 21.4% usando B10, mientras que en el resto de revoluciones no superan el 4.1%.

**Palabras Claves:** CO, CO<sub>2</sub>, B5, B10, biodiesel, algae, chlorella.

**Abstract:** This article presents an experimental study to evaluate the emissions of polluting gases in an engine using diesel of fossil origin and mixtures with biodiesel based on algae at 5 and 10%, denominated B5 and B10, respectively. The results show that CO emissions reduce up to 8.1% with the use of B5 and 11% with B10 throughout the range of revolutions tested, with the exception of 1500 rpm. In the case of CO<sub>2</sub>, an increase in emissions is generated with a maximum of 5% using biofuel, except in idling with B5 and at 3000 rpm using B10. NOx emissions have a high idle increase of 37% using B5 and 21.4% using B10, while in the rest of revolutions they do not exceed 4.1%.

**KeyWords:** CO, CO<sub>2</sub>, B5, B10, biodiesel, algae, chlorella.

## Introducción

El consumo cada vez más acelerado de combustibles fósiles y el aumento del calentamiento global amenazan el equilibrio ecológico de nuestro planeta, lo que motiva la búsqueda de energías renovables que reduzcan los efectos de la contaminación, como son los biocombustibles<sup>1</sup>. Sin embargo, el uso de biocombustibles de primera generación, procedentes de materias primas comestibles, podrían amenazar la soberanía alimentaria por lo cual se busca alternativas como los biocombustibles de tercera generación y mezclas de biodiesel con combustible convencional<sup>2</sup>.

En la producción de biocombustibles de tercera generación, las algas pueden ser la base para producir etanol, butanol, biodiesel, hidrógeno, metano y otros productos<sup>3, 4</sup>. La alta tasa de crecimiento, bajo consumo de agua, tasa de crecimiento elevada, hace atractivo el estudio de estos organismos para la producción de biodiesel como una alternativa de combustible limpio y renovable<sup>5, 6</sup>. Dependiendo de la cepa de algas, el contenido de lípidos está entre un 8% y un 40% de la biomasa<sup>7</sup>. El aceite extraído de la biomasa de algas/microalgas se compone principalmente de ácidos grasos insaturados como: ácidos palmitoleico, oleico, linoleico y linolénico<sup>8, 9, 10</sup>.

La materia prima, el método de extracción del aceite, la metodología de síntesis del biodiésel, por ejemplo, la transesterificación, y los procesos de refinación afectan directamente la calidad del biodiésel<sup>11, 12</sup>. Las propiedades químicas y termofísicas presentes en el biocombustible caracterizan las diferencias en la combustión respecto al diésel fósil<sup>13</sup>.

En lo que respecta a emisiones, debido al mayor contenido de oxígeno en el biodiésel a base de algas, las emisiones de CO y CO<sub>2</sub> disminuyen en referencia al diésel de origen fósil, permitiendo una combustión más completa; pero el aumento de temperatura en la combustión debido al contenido adicional de oxígeno en el biodiésel a base algas incrementa las emisiones de NOx<sup>14</sup>.

Rahman, y otros<sup>1</sup> utilizaron biodiesel obtenido de la especie *Jatropha curcas*. Se demostró que a varios regímenes de giro y carga que el uso de biocombustible reduce las emisiones de CO. Bajo tres modos de prueba en el motor (1000-1500 rpm; 10-15% carga) el uso de B10 redujo entre el 13.9 % y 16.7 % las emisiones de CO respecto al uso de diésel<sup>15</sup>.

Al-lwayzy y Yusuf<sup>5</sup> trabajaron con *Chlorella Protothecoides* (MCP-B) para motores de encendido por compresión. La combinación MCP-B100 mostró una mejor combustión con un aumento relativo de la eficiencia del motor. Las emisiones de CO<sub>2</sub> y CO se redujeron en un 4.2 y 28 % respectivamente, con un incremento de 15.8% de O<sub>2</sub> y 2 % en el número de cetano en comparación con diésel fósil<sup>5</sup>.

Con el uso de biodiesel a partir de aceite de soja (B10, B20, B50 y B100) se reducen las emisiones de CO entre 28 y 46%. En cuanto a emisiones de CO<sub>2</sub> se observó un incremento en el rango de 1 a 5.63% para las mezclas usadas. Todos estos ensayos se realizaron en condiciones de estado estacionario en un motor diésel de inyección directa de un solo cilindro en el rango de 1200 a 3000 rpm<sup>17</sup>. Tüccar y otros han demostrado que las emisiones de NOx aumentan debido a las altas

<sup>1</sup> 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.

temperaturas de combustión<sup>16</sup>.

Existen distintas variables a tomar en cuenta para la selección del aceite vegetal a usar en la elaboración del biodiesel. Entre las más significativas están la tasa de crecimiento de la especie vegetal, la robustez, los costos de producción y/o extracción, la disponibilidad de la materia prima, la calidad del biocombustible y sobretodo la incidencia en el rendimiento de los motores de combustión interna. Los estudios demuestran que las especies *Chlorella* y *Spirulina* son las más cultivadas e idóneas para la elaboración de biocombustibles<sup>18</sup>.

La mayoría de los estudios precedentes basan sus conclusiones en la experimentación con bancos de prueba que no representan en su totalidad las condiciones reales de trabajo a las que se someten los motores diésel. El presente trabajo aporta con pruebas en motores diésel y emisiones de escape (CO, CO<sub>2</sub> y NOx), con el uso de biodiésel a base de algas en proporción B5 y B10. Los resultados obtenidos son positivos en cuanto a la disminución de emisiones y favorecen el uso de Biodiésel a base de aceite de algas.

## Metodología

El presente proyecto es una disertación cuantitativa-experimental, la cual recoge los resultados de análisis de gases de escape emitidos por el motor en diferentes pruebas realizadas y con tres tipos de combustible a varios regímenes de giro del motor, con el respectivo análisis comparativo de los resultados obtenidos con diésel y biodiésel.

La medición de los gases emitidos (CO, CO<sub>2</sub>, NOx) fue realizada en la Ciudad de Ibarra, la cual se encuentra a 2200 msnm, con una presión atmosférica de 78 kPa y temperatura ambiente promedio de 20°C. Las pruebas fueron realizadas en un banco de pruebas motor Diésel Mitsubishi Cánter 4D31, con una cilindrada de 3,3 litros, 4 cilindros en línea, sistema de inyección de elementos en línea.

El combustible empleado fue diésel de origen fósil y biodiésel a base de aceite de algas en proporciones B5 (95% diésel fósil y 5% biodiésel) y B10 (90% diésel fósil y 10% biodiésel).

Es indispensable sangrar el combustible que se encuentra en todo el sistema de alimentación, previo a realizar las mediciones de los gases de escape (CO, CO<sub>2</sub>, NOx), con el fin de evitar mezclas internas no deseadas en las cañerías, filtros, bomba e inyectores del banco de pruebas.

Se empleó el analizador de gases BrainBee AGS-688, con la sonda y el sensor para medición de NOx. Para la obtención de las mediciones de los gases de escape, el banco de pruebas fue sometido a distintos regímenes de giro, como es el caso: 720 rpm (ralentí), 1500 rpm, 2500 rpm y 3000 rpm. En cada régimen y con cada uno de los combustibles: diésel fósil, biodiésel B5 y B10 se realizaron 5 pruebas.

## Resultados y discusión

Todos los resultados presentados a continuación son analizados en comparación al diésel de origen fósil.

### Emisiones de CO

La figura 1 detalla las emisiones de CO, usando B5, B10 y diésel fósil a diferentes regímenes del motor.

Con el uso de biodiésel en proporción B5, las emisiones de

CO del banco de pruebas a ralentí (720 rpm) arrojaron 0,0974 (% Vol); en proporción B10 se obtuvo 0,0952 (% Vol); mientras que con diésel fósil 0,106 (% Vol), evidenciando un descenso del 8,1% con B5 y 10,2% con B10.

A un régimen de 1500 rpm, las emisiones obtenidas con B5 fueron de 0,1192 (% Vol); con B10 0,1116 (% Vol); y con diésel 0,1112 (% Vol), mostrando un ligero aumento del 7,2% con B5, y del 0,4% con B10.

A 2500 rpm, se obtuvo 0,1252 (% Vol) con B5; 0,1144 (% Vol) con B10 y con diésel 0,1276 (% Vol). Lo que representa una disminución de 1,9% usando B5 y del 10,3% con B10.

Finalmente, las emisiones de CO a 3000 rpm fueron de 0,1046 (% Vol) con mezcla B5; 0,0934 (% Vol) con B10 y 0,105 (% Vol) con diésel. Obteniendo una reducción del 0,4% y 11% con B5 y B10 respectivamente.

### Emisiones de CO<sub>2</sub>

La figura 2 detalla las emisiones de CO<sub>2</sub>, usando B5, B10 y diésel fósil a diferentes regímenes del motor.

En proporción B5, las emisiones de CO<sub>2</sub> a 720 rpm mostraron 2,34 (% Vol); en proporción B10 se obtuvo 2,48 (% Vol); mientras que con diésel fósil 2,44 (% Vol), evidenciando un descenso del 4,1% con B5 y un aumento del 1,6% con B10.

A 1500 rpm, con B5 fueron de 2,48 (% Vol); con B10 2,54 (% Vol); y con diésel 2,42 (% Vol), mostrando un aumento del 2,5% con B5, y del 5% con B10.

A 2500 rpm, se obtuvo 3,18 (% Vol) con B5; 3,12 (% Vol) con B10 y diésel. Lo que representa un incremento de 1,9% usando B5.

Las emisiones de CO<sub>2</sub> a 3000 rpm fueron de 3,84 (% Vol) con mezcla B5; 3,66 (% Vol) con B10 y 3,78 (% Vol) con diésel. Obteniendo un aumento del 1,6% con B5 y un decrecimiento del 3,2% con B10.

### Emisiones de NOx

La figura 3 detalla las emisiones de NOx, usando B5, B10 y diésel fósil a diferentes regímenes del motor.

Con B5, las emisiones de NOx a ralentí, fueron de 331,8 (ppm); en proporción B10 se obtuvo 294 (ppm) y con diésel fósil 242,2 (ppm), evidenciando un aumento del 37% con B5 y del 21,4% con B10.

A 1500 rpm, las emisiones con B5 fueron de 217,8 (ppm); con B10 213,4 (ppm); y con diésel 211,8 (ppm), mostrando un aumento del 2,8% con B5, y del 0,8% con B10.

A un régimen de 2500 rpm, se obtuvo 175,2 (ppm) con B5; 179,2 (ppm) con B10 y 172,2 (ppm) con diésel fósil. Lo que representa un incremento de 1,7% usando B5 y 4,1% con B10.

A 3000 rpm, las emisiones de NOx fueron de 322,2 (ppm) con mezcla B5; 321,4 (ppm) con B10 y 318,2 (ppm) con diésel. Obteniendo un aumento del 1,3% con B5 y 1% con B10.

## Conclusiones

El uso de aceite de algas para la elaboración de biocombustibles presenta algunas ventajas en lo que respecta al ambiente y uso de tierras, además de altos niveles de insaturación; por ende el estudio del uso en motores Diesel es de suma importancia, sobre todo en lo que respecta al rendimiento y emisiones de gases a la atmósfera.

Luego de los resultados obtenidos en la presente investigación, se concluye que respecto al uso de diésel de origen fósil, el biocombustible de aceite de algas en proporción B5 coadyuva con la disminución de emisiones de CO en todos los regímenes ensayados, a excepción de 1500 rpm.

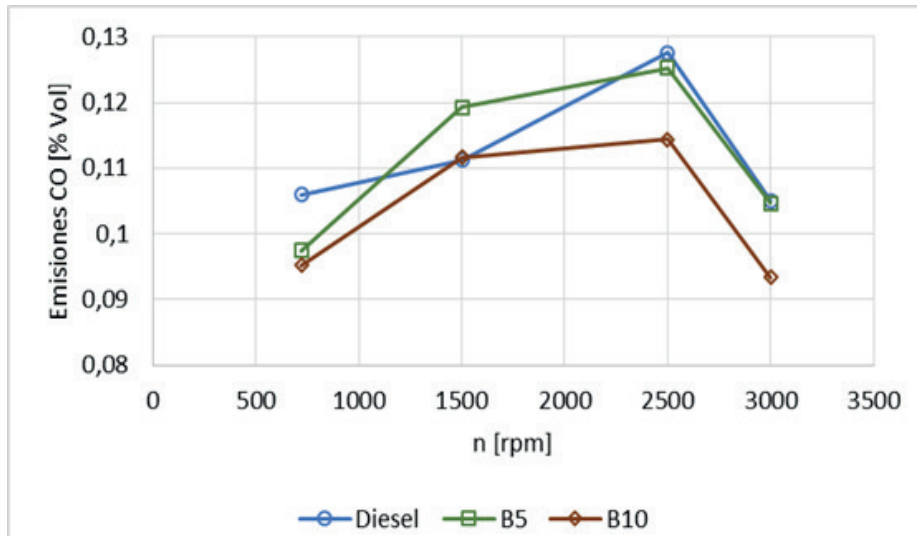


Figura 1. Emisiones de CO.

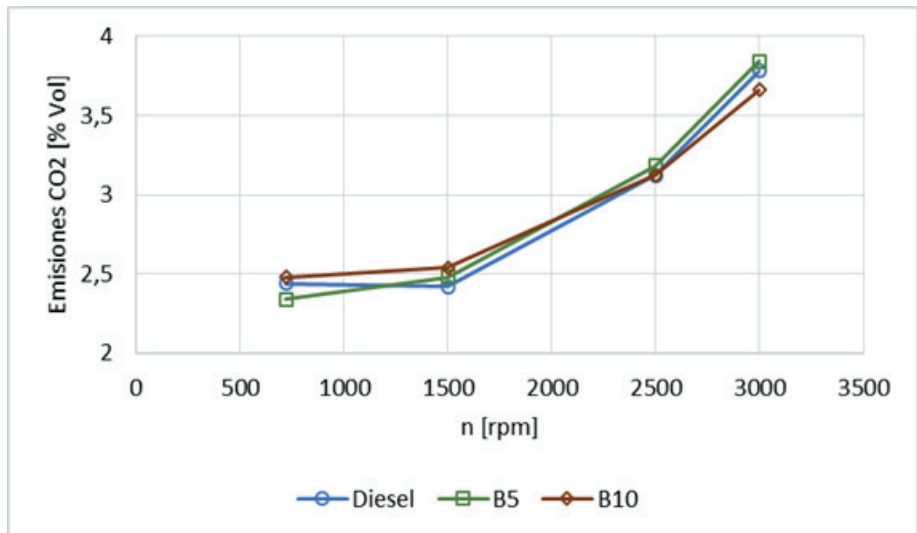


Figura 2. Emisiones de CO<sub>2</sub>.

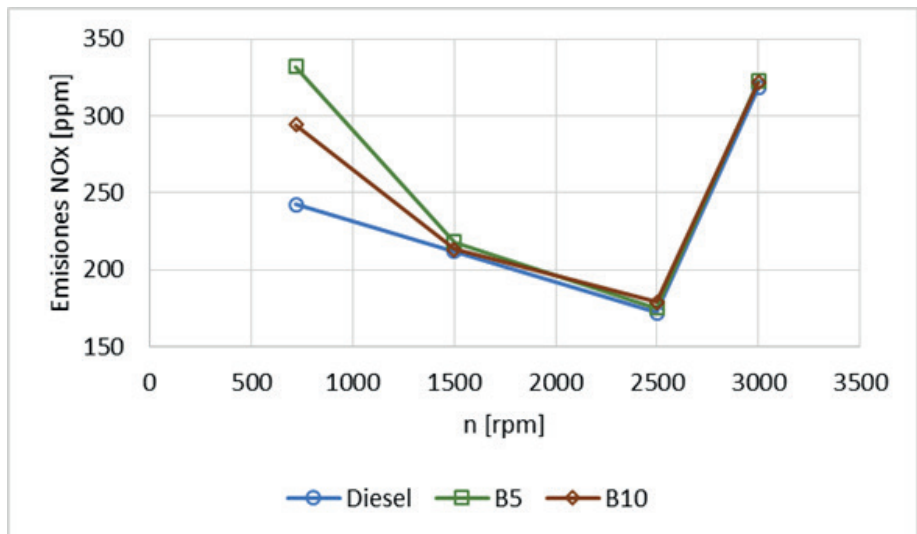


Figura 3. Emisiones de NO<sub>x</sub>.

Las emisiones de CO<sub>2</sub> se incrementan en todo el rango de revoluciones, a distinción de ralentí. En lo que respecta a NO<sub>x</sub>, a un régimen de 720 rpm se observa un elevado incremento de las emisiones, mientras que en el resto de revoluciones la diferencia es mínima.

Con mezcla B10 las emisiones de CO se redujeron con la misma similitud en ralentí, 2500 rpm y 3000 rpm, pero en 1500 rpm, hay un ligero aumento, el cual es prácticamente despreciable. Por otra parte, el CO<sub>2</sub> aumentó en bajas rpm, no presentó cambios a 2500 rpm y disminuyó a 3000 rpm, esto debido al mayor contenido de oxígeno en el biodiésel de aceite de algas, permitiendo un mejor quemado de la mezcla, lo cual eleva la temperatura en la cámara de combustión, incrementando las emisiones de NO<sub>x</sub> en todo el rango de revoluciones, especialmente en ralentí.

## Referencias bibliográficas

1. Sakthivel R, Ramesh K, Purnachandran R, Shameer PM. A review on the properties, performance and emission aspects of the third generation biodiesels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2018; 82: p. 2970-2992.
2. Hasan MM, Rahman MM. Performance and emission characteristics of biodiesel–diesel blend and environmental and economic impacts of biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017; 74: p. 938-948.
3. Nhat PVH, Ngo HH, Guo WS, Zhang XB, Guo JB, Chang SW, et al. Can algae-based technologies be an affordable green process for biofuel production and wastewater remediation? *Bioresource technology*. 2018.
4. Satputaley E, Chawane C, Deshpande NV. A critical review of biofuel from algae for sustainable development. *Conference on Innovative paradigms in engineering and technology*. 2012; V(10).
5. Al-lwazy SH, Yusaf T. Diesel engine performance and exhaust gas emissions using Microalgae *Chlorella protothecoides* biodiesel. *Renewable Energy*. 2017; 101: p. 690-701.
6. Ramachandra TV, Madhab MD, Shilpi S, Joshi NV. Algae biofuel from urban waste water in India: scope and challenges. *Renew Sustain Energy*. 2013; 21(77).
7. Ahmad AL, Mat-Yasin NH, Derek C, Lim J. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production. *Renew Sustain Energy*. 2011; 15(584).
8. Gouveia L. *Microalgae as a feedstock for biofuel* springer briefs in microbiology. Netherlands Springer. 2011.
9. Fisher B, Marchese A, Volckens A, Lee T. Measurement of gaseous and particulate emissions from algae based fatty acid ethyl esters. *SAE Int Fuel Lubricants*. 2010; 3(9).
10. Demirbas A, Demirbas M. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Convers Manag*. 2011; 52(163).
11. Demirbas A, Demirbas M. *Algae as a new source of biodiesel green energy and technology*. London Springer. 2010.
12. Borowitzka M, Moheimani N. *Algae for biofuels and energy developments in applied phycology*. Netherlands Springer. 2013.
13. An H, Yang W, Maghbouli A, Li J, Chou S, Chua K. Performance combustion and emissions characteristics of biodiesel derived from waste cooking oils. *Applied Energy*. 2012; 11(2).
14. Özener O, Yüksek L, Ergenç AT, Özkan M. Effects of soybean biodiesel on a DI diesel engine performance, emission and combustion characteristics. *Fuel*. 2014; 115: p. 875-883.
15. Rahman SMA, Masjuki HH, Kalam MA, Abedin MJ, Sanjid A, Imtenan S. Effect of idling on fuel consumption and emissions of a diesel engine fueled by *Jatropha* biodiesel blends. *Journal of Cleaner Production*. 2014; 69: p. 208-215.
16. Tuccar G, Ozgur T, Aydin K. Effect of diesel microalgae biodiesel butanol blends on performance and emission characteristics of biodiesel derived from waste cooking oils. *Applied Energy*. 2014; 4(2).
17. Pandey A, Lee D, Chisti Y, Soccol C. *Biofuels from algae*. Great Britain. 2011; 5(4).
18. An H, Yang WM, Maghbouli A, Li J, Chou SK, Chua KJ. Performance, combustion and emission characteristics of biodiesel derived from waste cooking oils. *Applied Energy*. 2013; 112: p. 493-499.

**Recibido:** 29 mayo 2018

**Aprobado:** 4 agosto 2018

## RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

# Disminución de grasa corporal local utilizando hidrolipoclasia. (Decrease in local body fat using hydrolipoclasia).

Marco Antonio Conde Pérez, Esteban Waliszewski Zamorano, Daisy Irais Nava Morales, Stephany Angelina Aguila Mora.

DOI. 10.21931/RB/2018.03.03.7

**Resumen:** La obesidad, se refleja en la distribución corporal de los depósitos de grasa tornándose a una condición estética que afecta a la población en general. Para su manejo, existe una técnica no quirúrgica, efectiva y segura llamada hidrolipoclasia ultrasónica siendo ésta una alternativa terapéutica para el manejo de adiposidad. El objetivo del estudio fue aplicar a las 64 pacientes, el tratamiento y determinar las medidas antropométricas antes y después de dos semanas del tratamiento. El peso dos semanas después del tratamiento disminuyó un 2%, la cintura bajó un 8.0 %, el porcentaje de grasa corporal disminuyó 6.4%, la masa muscular aumento 1.3% y el índice de la circunferencia de cadera versus cintura bajó un 0.2%. En conclusión la hidrolipoclasia ofrece una reducción de depósitos de adiposidad localizada, más no para bajar de peso corporal en forma significativa. Los pacientes después de solo una aplicación mostraron disminución de la cintura en un 8% sin aplicar una dieta y/o actividad física..

665

**Palabras Claves:** hidrolipoclasia, adiposidad, medidas antropométricas.

**Abstract:** Obesity is reflected in the corporal distribution of fat deposits, turning into an aesthetic condition that affects the population in general. For its management, there is a non-surgical, effective and safe technique called ultrasonic hydrolipoclasia, this being a therapeutic alternative for the management of adiposity. The objective of the study was to apply to the 64 patients, the treatment and determine the anthropometric measures before and after two weeks of treatment. The weight two weeks after the treatment decreased by 2%, the waist decreased by 8.0%, the percentage of body fat decreased by 6.4%, the muscle mass increased by 1.3% and the waist circumference index versus waist decreased by 0.2%. In conclusion, hydrolipoclasia offers a reduction of deposits of localized adiposity, but not to lose body weight significantly. Patients after only one application showed waist loss by 8% without applying a diet and/or physical activity.

**KeyWords:** hydrolipoclasia, adiposity, anthropometric measurements.

## Introducción

La obesidad, es una enfermedad crónica de origen multifactorial, debido al aumento de la grasa corporal, originado por un balance calórico positivo y un aporte calórico elevado, así como por una reducción del gasto energético y la combinación de ambos factores. Ésta, se refleja en la distribución corporal de los depósitos de grasa que a su vez puede constituir un riesgo para la salud y definir las enfermedades. Cuando se forman los depósitos de grasa en la parte central (obesidad androide) comparando con la grasa periférica, estos depósitos se asocian con alteraciones en varias funciones fisiológicas del organismo<sup>1</sup>. Así, la obesidad androide, se caracteriza por el aumento del tejido adiposo en la región del abdomen, considerando este depósito un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, dislipidemia y síndrome metabólico. Aunado a los factores patológicos, existe un trastorno estético, ya que no es posible disminuir la adiposidad localizada en el abdomen a través de dietas, sino requiere de unos tratamientos complementarios<sup>2</sup>.

La adiposidad localizada, es una condición estética que afecta a la población en general, sin embargo no es posible precisar su magnitud, frecuencia ni distribución, debido a que no existen estadísticas que lo informen. Se sabe, que es causa muy frecuente la consulta en medicina estética por la inconformidad física y emocional en los pacientes que la presentan. Es prevalente en ambos sexos, en diferentes

edades y en distintas razas. Hay factores que predisponen a padecerla, dentro de los cuales se puede mencionar factores genéticos, malos hábitos alimentarios y el sedentarismo<sup>3</sup>.

La percepción del peso elevado o el sobrepeso son factores que se muestran con una alta prevalencia de trastornos psicológicos, tanto en hombres como en mujeres. Estas personas buscan tratamientos encaminados a disminuir su peso y a reducir la cantidad de grasa acumulada en distintas partes del cuerpo<sup>4</sup>. En mujeres con sobrepeso (índice de masa corporal entre 25 y 29.9 kilogramos/metro<sup>2</sup>), en mujeres obesas (índice de masa corporal mayor de 30 kilogramos/metro<sup>2</sup>) y en hombres con obesidad grado III (índice de masa corporal mayor de 40 kilogramos/metro<sup>2</sup>) la prevalencia de depresión y ansiedad, es significativamente más alta que en los individuos con un índice de masa corporal normal<sup>3,5</sup>.

Para el manejo de la obesidad, existe una técnica conocida como hidrolipoclasia, calificada por algunos médicos de medicina estética, como efectiva y segura, pero debido a una reducida evidencia, no existen consensos y se presentan discrepancias en la manera de aplicarla. La hidrolipoclasia ultrasónica, o simplemente hidrolipoclasia, es una técnica médica que ofrece una alternativa terapéutica para el manejo de adiposidad. Ésta, consiste en la infiltración de agua en los tejidos y posterior aplicación de ultrasonido para generar cavitación, que produce las micro-burbujas, explosión y ruptura de los materiales biológicos; en este caso, en las células

<sup>1</sup> Estudios de Postgrado, Instituto de Estudios Superiores en Medicina, Xalapa Ver., México.



del tejido adiposo<sup>3, 6, 7</sup>. El efecto micromecánico por la acción directa de las ondas ultrasónicas produce desplazamiento de las moléculas intracelulares, su difusión a espacio extracelular, ruptura macromolecular, ruptura de uniones intermoleculares, modificación espacial de las proteínas, desnaturalización de las membranas celulares y las modificaciones electroquímicas en la superficie celular. Con esto, se alteran los compartimientos celulares y la función celular<sup>8, 9, 10</sup>. Las estructuras más delicadas que son las células endoteliales y células adiposas, se dañarán más fácilmente comparando con las estructuras más resistentes (tejido conectivo y hueso). Cuando la membrana del adipocito se rompe por efecto del ultrasonido, la grasa depositada en los adipocitos como triglicéridos, moléculas conformadas por glicerol y ácidos grasos libres, se liberan al espacio extracelular. En este espacio una enzima, la lipoproteínlipasa, metaboliza los triglicéridos, el glicerol y los ácidos grasos libres. Los últimos se unen a albuminas y el glicerol (hidrosoluble), entran en la circulación y de esta manera se trasladan hasta el hígado. Algunos triglicéridos no se metabolizan y son aprovechados por las lipoproteínas (VLDL, luego LDL y LDL) y también llevados al hígado. En el hígado, los ácidos grasos libres y el glicerol, se metabolizan y se aprovechan en diferentes procesos metabólicos incluyendo el consumo energético requerido por el organismo<sup>11</sup>.

Algunos médicos estéticos consideran la hidrolipoclasia como una técnica efectiva para disminuir la adiposidad localizada. Así mismo, esta técnica inicialmente desarrollada por el médico italiano Maurizio Ceccarelli en el año 1990, fue sujeta a diferentes modificaciones aportadas por la experiencia de cada profesional que la utiliza, logrando diversidad de resultados medidos en su aplicación.

El objetivo del estudio fue aplicar a las 64 pacientes con un grado de índice de masa corporal mayor de 30 kg/m<sup>2</sup> el tratamiento de hidrolipoclasia ultrasónica y determinar las medidas antropométricas dos semanas posteriores al tratamiento.

## Materiales y métodos

### Muestra

En el estudio participaron 64 pacientes femeninas que acudieron a los consultorios médicos estéticos con problemas de sobrepeso y un índice de masa corporal superior a los 30 kg/m<sup>2</sup> para aplicar el tratamiento de hidrolipoclasia, con el afán de reducir su masa corporal. Las pacientes firmaron un consentimiento informado para aplicar el procedimiento.

### Procedimiento

La función del ultrasonido en la reducción de la grasa, se basa en un efecto llamado cavitación, donde los pulsos de ondas ultrasónicas crean ondas de compresión que dentro de los adipocitos generan pequeñas burbujas, las cuales pueden ser estables ya que se expanden y contraen de forma rápida o bien las inestables, que se expanden de tal manera que llegan a un límite e implotan rompiendo la estructura celular y liberan su contenido con los restos celulares al espacio intracelular<sup>2</sup>.

Se aplicó la técnica descrita por el doctor Maurizio Ceccarelli que considera una demarcación con lápiz dermatográfico el área a tratar y medición el grosor de pánículo adiposo con ultrasonido a 7.5 MHz para poder escoger el largo de la aguja que permita infiltrar el líquido al tercio inferior del espesor entre la línea hiperecogénica de la dermis profunda y la línea

hiperecogénica de la fascia muscular<sup>12</sup>. Se aplicó la solución salina fisiológica con un anestésico local al 2% (lidocaína) para mitigar el dolor generado por la compresión de las terminaciones nerviosas al momento de la infiltración del líquido y bicarbonato de sodio a concentración de diez miliequivalentes por mililitro (mEq/mL) inhibiendo las variaciones del pH que generan sensación de quemadura al momento de la inyección. Se mezclaron en una jeringa de 20 ml, 0.5 ml de bicarbonato de sodio, 0.5 ml de lidocaína y se completó el volumen con 19 ml de la solución salina fisiológica. Mediante un multiinyector con cinco agujas, se aplicaron dos mililitros de la solución por punto hasta cubrir el área del tratamiento en su totalidad. Posteriormente, se retiraron las agujas y se desinfectó la superficie<sup>12</sup>. Después, se aplicó el gel conductor en el área tratada y se pasó un ultrasonido a 3 MHz, en modo continuo. El transductor del ultrasonido, se movió de manera lenta y continua por el tiempo establecido, considerando el número de punciones del multiinyector multiplicado por dos (por ejemplo diez punciones requieren un periodo de 20 minutos). Para finalizar el tratamiento, se retiró el gel de las zonas tratadas y se desinfectó el área tratada<sup>12</sup>. En medicina estética, se recomienda utilizar la frecuencia del ultrasonido a 3 MHz, debido que la capa adiposa y de la piel se encuentran en la superficie<sup>13</sup>.

### Análisis estadístico

Los resultados, se presentan como variables nominales y ordinales de las distribuciones de frecuencias. En las variables numéricas, se utilizaron medidas de tendencia central (promedios X) y medidas de dispersión (desviación estándar DE). Los resultados se muestran en tablas y gráfico de frecuencias. Para calcular las diferencias entre las medias de las variables continuas, se utilizaron la prueba paramétrica t de Student. Se calculó eficiencia del tratamiento comparando las mediciones antes y después del tratamiento. Los análisis estadísticos, se realizaron para un nivel de error tipo I de 0,05 utilizando el programa estadístico Minitab versión 16.

## Resultados

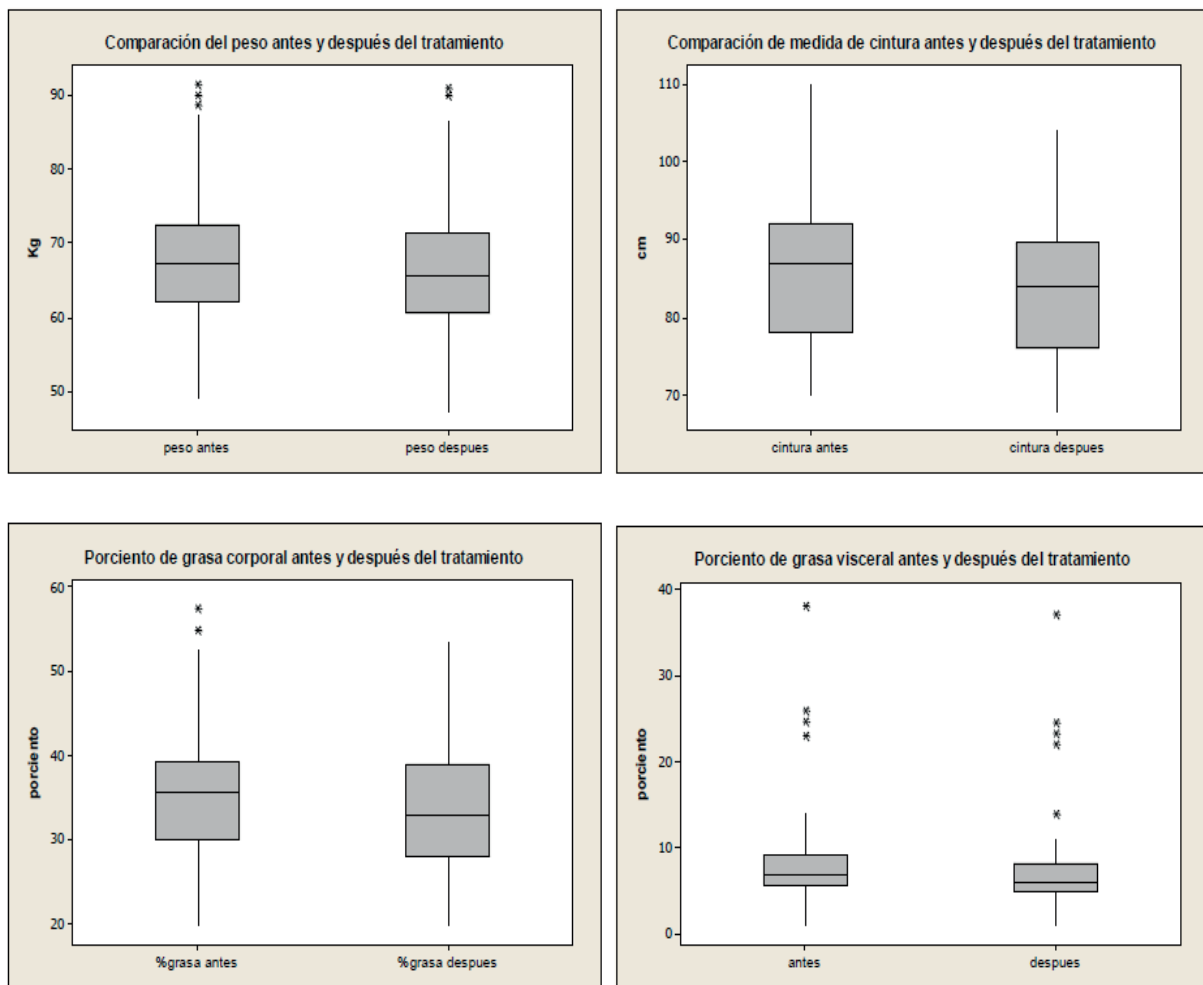
Los datos presentes en Tabla 1 incluyen las variables de las medidas estudiadas antes y dos semanas después de solo una sesión del tratamiento de hidrolipoclasia. Se examinó y comparó la base de datos para cada una de las mediciones descritas: medida de la cintura, porcentaje de grasa corporal, porcentaje de grasa visceral, masa muscular, índice de medida de cintura – cadera y el porcentaje de eficiencia del tratamiento.

Los pacientes sometidos a solo una sesión del tratamiento de hidrolipoclasia no presentaron antecedentes patológicos, así tampoco guardaron un régimen alimentario de una dieta específica para bajar de peso ni una práctica de la actividad física. Para los pacientes, la hidrolipoclasia era una experiencia terapéutica nueva y de selección.

Al comparar el peso inicial y dos semanas después del tratamiento, se observó disminución promedio de 2% del peso corporal, sin lograr ésta una diferencia estadísticamente significativa en la baja del peso. Se debe tener en cuenta, que la comparación de las medidas, se hizo entre los promedios de las medidas iniciales y dos semanas después del tratamiento. La medición de la cintura reveló un descenso de la medida en un 8.0 %, pero el valor tampoco fue estadísticamente significativo, al igual que el porcentaje de grasa corporal cuya disminución fue de un 6.4%, mientras que el porcentaje de grasa visceral bajo un 5.9%. Al aplicar la prueba de comparación

Variable	Antes	Después	t-Student p	Eficiencia %
<b>Peso (kg)</b>	68.0 ± 9.0	66.7 ± 8.8	0.396	2.0
<b>Cintura (cm)</b>	85.9 ± 8.8	83.2 ± 8.7	0.081	8.0
<b>% de grasa corporal</b>	35.2 ± 7.6	33.2 ± 7.2	0.134	6.4
<b>% grasa visceral</b>	8.7 ± 6.7	8.2 ± 6.5	0.716	5.9
<b>Masa muscular</b>	36.8 ± 12.9	37.3 ± 12.4	0.846	1.3
<b>Índice cadera - cintura</b>	0.79 ± 0.18	0.79 ± 0.15	0.996	0.2

**Tabla 1.** Comparación de medidas antropométricas antes y después del tratamiento de hidrolipoclasia y el cálculo de la eficiencia del tratamiento.



**Figura 1.** Comparación de medidas antropométricas antes y después del tratamiento de hidrolipoclasia.

de medias (t de Student), estas disminuciones no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ). La masa muscular debido a la disminución de la grasa corporal aumentó 1.3%, sin una evidencia estadística significativa. El índice medido de la circunferencia de cadera versus cintura, mostró una baja de un 0.2% sin ser ésta estadísticamente significativa.

Al analizar las historias clínicas de pacientes tratados, no se reportó ninguna complicación a causa del tratamiento y sólo se encontraron reportes de efectos secundarios (equimosis y hematomas).

## Discusión

La ganancia y pérdida de peso son fundamentales en la etiopatogenia de la adiposidad. Sus efectos en la salud, independientemente del cambio de peso, pueden ser difíciles de cuantificar debido a su asociación con los cambios necesarios en la ingesta calórica, la actividad física y el estilo de vida, factores que influyen en la pérdida de peso.

En un estudio llevado a cabo por Norberto Palavecino<sup>14</sup>, se evaluó los resultados de la técnica de hidrolipoclasia

con la mezcla clásica de Ceccarelli versus una mezcla teóricamente hipotónica con respecto a la anterior. Ésta mezcla adicionalmente incluyó fármacos lipolíticos debido a que la mezcla hipotónica puede ser fácilmente absorbida por la célula adiposa y luego de la hidrolipoclasia pueden actuar mejor las sustancias lipolíticas. A un paciente sexo femenino, de 64 años a quien se le estudio su composición corporal, se tomaron mediciones bilaterales de los perímetros y se realizó en un muslo el tratamiento clásico y en el muslo contralateral, el tratamiento modificado. Además, en ambos lados se realizó mesoterapia. No se le indicó ni dieta ni actividad física. El estudio duró 140 días con aplicaciones cada siete días de hidrolipoclasia en la parte lateral de los muslos y cada siete días mesoterapia con benzopirona + buflomedil + procaína + pentoxifilina en cara interna y externa de los muslos. Las sesiones fueron alternadas de tal forma que los martes se le hacía mesoterapia y los jueves la hidrolipoclasia. Al finalizar el estudio, se tomaron nuevamente las medidas y como resultado final se encontró, que el área tratada con hidrolipoclasia tradicional (Ceccarelli) redujo un 36% de grasa comparado con el 31.25% del contralateral, La diferencia entre ambas áreas y mezclas utilizadas, no fue estadísticamente significativa. De esto se concluye, que al agregar sustancias lipolíticas a una mezcla para hidrolipoclasia ultrasónica, no se mejoró la capacidad del método aplicado para reducir volúmenes de grasa en la región de adiposidad localizada de los muslos.

Al analizar el número de sesiones, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el resultado final<sup>3</sup>. Comparando cada sesión con la subsiguiente, para cada variable dependiente, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las medidas cotejando con pacientes con solo una sesión. A pesar de no existir diferencia estadísticamente significativa entre una sesión y la sesión subsiguiente, se presentaron diferencias significativas en las medidas aplicadas a los pacientes que tuvieron una y varias sesiones<sup>3</sup>. Este dato concuerda con nuestros resultados de que sólo una sesión de hidrolipoclasia, logra una disminución de grasa corporal.

Al comparar el peso corporal al inicio del tratamiento con el peso posterior en la sesión subsiguiente de hidrolipoclasia, se encontró una diferencia estadísticamente significativa hasta la quinta sesión<sup>3</sup>. Las observaciones permitieron calcular la diferencia hasta la tercera sesión obteniendo 2,39 kg de disminución de peso y la conclusión de una mayor disminución después de la primera sesión (1,44 kg). En las medidas de contorno, cintura y ombligo, se encontró una diferencia estadísticamente significativa hasta después de la cuarta sesión. En la medida de cintura, no se encontró diferencia entre la segunda y la tercera sesión<sup>3</sup>, mientras que nuestro estudio reveló una eficiencia en disminuir la cintura hasta un 8% resultado que concuerda con los datos de Fernández-Tresguerres y Insua Nipoti<sup>1</sup>, Chartuni y col.<sup>15</sup>.

El estudio de Song y col.<sup>16</sup> demostró que las soluciones hipotónicas pueden incrementar significativamente el diámetro de los adipocitos humanos. El uso de solución salina tiene un efecto significativo para el diámetro de las células en los primeros 15 minutos del tratamiento. El estudio concluyó, que una solución tumescente con una osmolaridad de un cuarto isotónica podría facilitar la lipoplastia ultrasónica. En sus análisis autores precisaron que un incremento de 15% en el diámetro celular, lleva a un incremento de su volumen y de la tensión superficial. Además, se determinó que el potasio no juega un papel significativo en el balance hídrico indicando al

sodio como el principal ion en determinar el balance hídrico entre la solución y el espacio intracelular.

Ordiz<sup>17</sup> indicó a unos errores conceptuales de la técnica descrita por Ceccarelli, sobre todo en la frecuencia de inyecciones excesivas, así como la riesgosa práctica de asociar productos de difícil justificación y/o de origen desconocido<sup>16, 18</sup>. Además, Ríos<sup>19</sup> afirmó que la hidrolipoclasia contribuye a la remoción de los depósitos de grasa, siempre y cuando el paciente se encuentre en lipólisis promovida por la dieta y un programa de ejercicio. Mientras el paciente consume harinas o azúcar, el cuerpo utiliza estas fuentes de energía de forma preferente y se imposibilita que se quemé la grasa. El ejercicio acelera la pérdida de grasa y crea una situación de mayor demanda de energía. Inclusive aún procedimientos quirúrgicos tales como la liposucción pueden resultar en un fracaso sin dieta ni ejercicio porque la grasa continuará depositándose en los sitios tratados. En nuestro estudio, las pacientes no aplicaron ninguna dieta recomendada y tampoco se sometieron a unos ejercicios para acelerar la remoción de grasa depositada.

La hidrolipoclasia, se considera un procedimiento poco invasivo de inyección local de solución salina con la aplicación de ultrasonido que permite remover los depósitos grasos en las sesiones programadas de acuerdo a la progresión del resultado. Una vez que se pierde la grasa, la piel puede tornarse flácida si no se consigue que la piel se retraiga de forma armónica. Esta técnica por conllevar a la formación de edema moderado indica que las sesiones no deben repetirse en las mismas zonas hasta pasados 15 o 20 días<sup>17, 20</sup>.

Los médicos que aplican la hidrolipoclasia han expresado que este procedimiento requiere varias sesiones para obtener mejores resultados. Pese a esto, después de solo una sesión aplicada en nuestro estudio, se logró una reducción de medidas antropométricas, observadas en la tabla 1 y figura 1. Por lo que permite plantear que la primera sesión, es la que más efecto tiene en términos de reducción de medidas estudiadas.

## Conclusiones

La hidrolipoclasia ofrece a los pacientes un procedimiento para reducir depósitos de adiposidad localizada, mas no para bajar de peso corporal en forma significativa (en este estudio con solo una aplicación se redujo el peso corporal en un 2%). Los pacientes mostraron disminución de la cintura en un 8% y si a éste, se adjunta una dieta y/o actividad física omitidas por las participantes en este estudio, se puede lograr un resultado de significancia mayor.

## Referencias bibliográficas

1. Fernández-Tresguerres Hernández JA, Insua Nipoti E. Tratamiento de adiposidades localizadas mediante técnicas no quirúrgicas. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*. 2012;32(2):37-43.
2. Valentim da Silva RM, Froes Meyer P, Ranaco Santos B, Oliveira Félix JL, Ronzio OA. Efectos del ultrasonido de alta potencia en la adiposidad localizada. *Fisioterapia*. 2015; 37:55-58.
3. Eraso JC, Motta AM. Hidrolipoclasia abdominal: Variaciones técnicas y resultados antropométricos en tres centros de medicina estética de Bogotá. *Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud Especialización en Medicina Estética Bogotá*, enero de 2011.
4. Alizadeh Z, Halabchi F, Mazaheri R, Abolhasani M, Tabesh M. Review of the mechanisms and effects of noninvasive body contouring devices on cellulite and subcutaneous fat. *Int J Endocrinol Metab*. 2016;14(4): e36727

5. Zhao G, Ford ES, Dhingra S, Li C, Strine TW, Mokdad AH. Depression and anxiety among US adults: associations with body mass index. *International Journal of Obesity* 2009;33:257-266.
6. Ceccarelli M. Ultrasonic Hydrolypoclasia (External Ultrasound). Goldman MP, Bacci PA, Leibaschoff G, Hexell D, Angelini F, ed. *Cellulite Pathophysiology and Treatment*. NY: USA. Taylor & Francis Group; 2006:242-246.
7. Palumbo P, Cinque B, Miconi G, la Torre C, Zoccali G, Vrentzos N, Vitale AR, Leocata P, Lombardi D, Lorenzo C, d'angel B, Macchiarelli G, Cimini C, Cifone MG and Giuliani M. Biological effects of low frequency high intensity ultrasound application on ex vivo human adipose tissue. *Int J Immunopat Pharmacol* 2011;24(2): 411-422.
8. Pugliesei D, Maioran E, Pasconp M. Histopathological features of tissue alterations induced by low frequency ultrasound with cavitation effects on human adipose tissue. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 2013;26(2):541-547.
9. Bani D, Quattrini Li A, Freschi G, Lo Russo G. Histological and ultrastructural effects of ultrasound-induced cavitation on human skin adipose tissue. *Glob Open* doi: 10.1097/GOX.0b013e3182a7f222; published online 13 September 2013
10. Adatto MA, Adatto-Neilson RM, Morren G. Reduction in adipose tissue volume using a new high-power radiofrequency technology combined with infrared light and mechanical manipulation for body contouring. *Lasers Med Sci* 2014;29:1627-1631.
11. Spencer B. What Happens to the Fat After Treatment With the UltraShape Device. UltraShape LTDA. 2005
12. Melo González DC, Eraso Rodríguez JC. Hidrolipoclasia con solución salina hipotónica versus isotónica en adiposidad localizada. Universidad del Rosario Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud- Facultad de Medicina Especialización en Medicina Estética 2014 <http://repository.urosario.edu.co/bitstream/handle/10336/8854/53907114-2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (consultado 01 de febrero del 2018)
13. Brescia CM, Massa DA, Cruz LB, Júnior JVB, Agne JE. Análise morfológica do tecido adiposo subcutâneo submetido à estimulação por ultrassom associado à corrente elétrica: estudo piloto. *Rev Kinesia* 2009;1:3-8.
14. Palavecino EN. Hidrolipoclasia abdominal: variaciones técnicas y resultados antropométricos, en tres centros de medicina estética de Bogotá. Congreso de Estética y Antienvjecimiento, Madrid 16 de noviembre de 2009.
15. Chartuni JM, Santos Sossai L, Gomes Teixeira C. Efeitos do ultrassom 3 mhz associado à ativos lipolíticos na adiposidade infra-abdominal: ensaio clínico randomizado. *Perspectivas online Ciências Biológicas e da Saude* 2011;1(1):79-91.
16. Song AY, Bennett JM, Marra KG, Cimino WW, Rubin JP. Scientific basis for the use of hypotonic solutions with ultrasonic liposuction. *Aesthetic plastic surgery*. 2006;30(2):233-238.
17. Ordiz I. Mesoterapia y otras técnicas inyectivas en el tratamiento de la celulitis. VI Encuentro internacional de medicina estética y antienvjecimiento. Madrid 24 a 26 de noviembre 2006
18. Camargo FO, Ferrerica PE, De Moraes AM, Cintra ML. Cutaneous atypical mycobacteriosis after ultrasound hydrolypoclasia treatment. *Dermatologic Surgery*. 2009;35 (1):158-160.
19. Rios A. [http://www.susmedicos.com/O\\_Articulos\\_General/art\\_Adelgazar\\_SIN\\_cirurgia.htm](http://www.susmedicos.com/O_Articulos_General/art_Adelgazar_SIN_cirurgia.htm) consultado 25 de febrero 2018
20. Godoy FB, Fonseca BB, Levenhagen MA, Franco MA, Melo RT, Beletti ME. Structural Changes of fat tissue after nonaspirative ultrasonic hydrolypoclasia. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* 2011;4(2):105-110.

**Recibido:** 12 julio 2018

**Aprobado:** 4 agosto 2018

## CASE REPORTS / REPORTE DE CASO

### Sinus histiocytosis in cervical adenopathy, case report. Histiocitosis sinusal en adenopatía cervical única, reporte de caso.

Diego Valarezo-Sevilla<sup>1</sup>, Mario Alexei Buitrón-Ortega<sup>1</sup>, Adonis Frómata-Guerra<sup>1</sup>, Lourdes Rodríguez-Ramírez<sup>2</sup>, Vanessa Sarzosa-Terán<sup>3</sup>, Sandra Sánchez-Figueroa<sup>4</sup>

DOI. [10.21931/RB/2018.03.03.8](https://doi.org/10.21931/RB/2018.03.03.8)

**Abstract:** Rosai-Dorfman disease (RDD) is a rare histiocytosis which is typically accompanied by painless bilateral cervical lymphadenopathy. The laboratory data are non-specific and the histological characteristic which prevails is the presence of emperipolesis in large foamy histiocytes positive for CD68, S-100 and negative for CD1a. It is still difficult to determine the pathogenesis. The case of a male African-Ecuadorian young adult who made a consultation due to presenting right cervical adenopathy is presented.

**Key words:** Histiocytosis, adenopathy, emperipolesis.

**Resumen:** La enfermedad de Rosai-Dorfman (RDD) es una histiocitosis rara, que en forma típica se acompaña de linfadenopatía cervical bilateral indolora. Los datos de laboratorio son inespecíficos y la característica histológica que predomina es la presencia de emperipolesis en histiocitos grandes espumosos positivos para CD68, S-100 y negativos para CD1a. La patogénesis sigue siendo difícil de establecer. Se presenta el caso de un paciente masculino afroecuatoriano adulto joven, quien acudió a consulta por presentar adenopatía cervical derecha única.

**Palabras clave:** Histiocitosis, adenopatía, emperipolesis.

#### Introduction

The lymphadenopathy is a frequent reason for consultation in ambulatory care, being mostly benign and self-limited. Causes may include infections, autoimmune diseases and malignance, as well as iatrogenic disorders. To define the etiology, diagnosis includes laboratory tests, images, ganglionic or bone marrow biopsy, depending on the clinical condition, localization and distribution of lymph nodes and risk factors<sup>1</sup>.

Rosai-Dorfman Disease is characterized by non-painful cervical lymphadenopathies which may compromise other lymph nodes, and in 43% of the cases it may be accompanied by extranodal condition, having an unpredictable clinical evolution with remission and exacerbation episodes. The histological characteristics are infiltration of lymph nodes sinuses due to mononuclear or multinuclear histiocytes, the cytoplasm of which is often full of lipids; there are also emperipolesis lesions of blood cells (vacuole aspect which comprises lymphocytes, plasmocytes, polymorphonuclear leucocytes or red blood cells)<sup>2</sup>.

#### Clinical case

Male patient of 47 years of age, with personal pathological history of right groin hernioplasty ten years ago and head trauma four years ago, which caused right laminar epidural hematoma (not operated) and fracture of right petrous bone with effects of peripheral facial paralysis. The patient visits Hospital General Ibarra due to showing right cervical region mass of several months, without specifying the exact time of evolution.

During physical examination, the only thing evidenced which draw attention is right cervical adenopathy of 1.5 cm, non-painful and non adhered to deep planes; no hepatomegaly,

no splenomegaly, no petechiae, no ecchymosis.

Exams are requested, evidencing a normal hemogram, normal liver and renal tests, normal globular sedimentation velocity, normal antinuclear antibodies, rheumatoid factor; cytomegalovirus, HIV, Epstein-Barr: negative, ultrasound: left renal lithiasis without ectasia; no hepatomegaly, no splenomegaly, chest radiography: normal.

With the foregoing we have diagnosed the Rosai-Dorfman disease (sinus histiocytosis). The patient has been kept with regular controls for one year without showing new adenopathies or signs or systemic condition (by means of imaging studies), so that management of this case has not required any systemic therapy, only observation.

#### Discussion

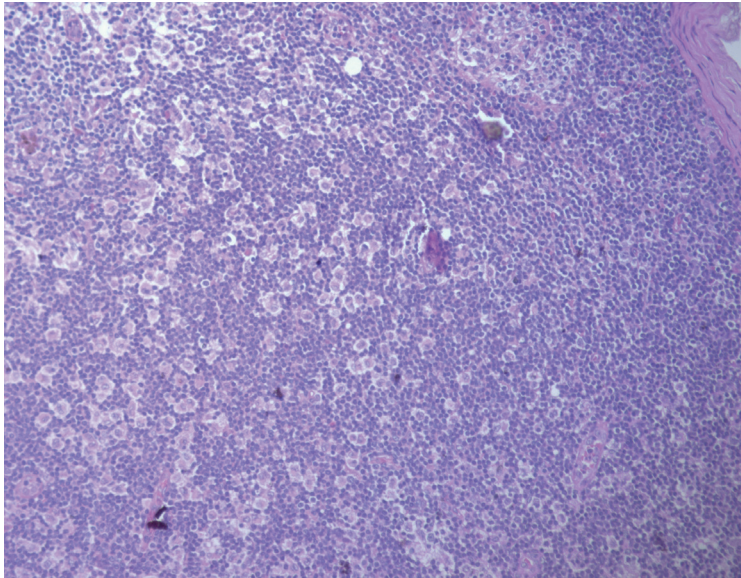
Rosai-Dorfman Disease (Destombes-Rosai-Dorfman for other authors), is a disorder of non-Langerhans cell histiocytosis characterized by intrasinusoidal proliferation of abnormal histiocytes in sinuses of lymph nodes, lymph vessels of internal organs and in other extranodal sites. It is more common in chil-

<sup>1</sup> Servicio de Medicina Interna, Hospital General Ibarra. Ibarra, Ecuador.

<sup>2</sup> Servicio de Anatomía Patológica, Hospital General Ibarra. Ibarra, Ecuador.

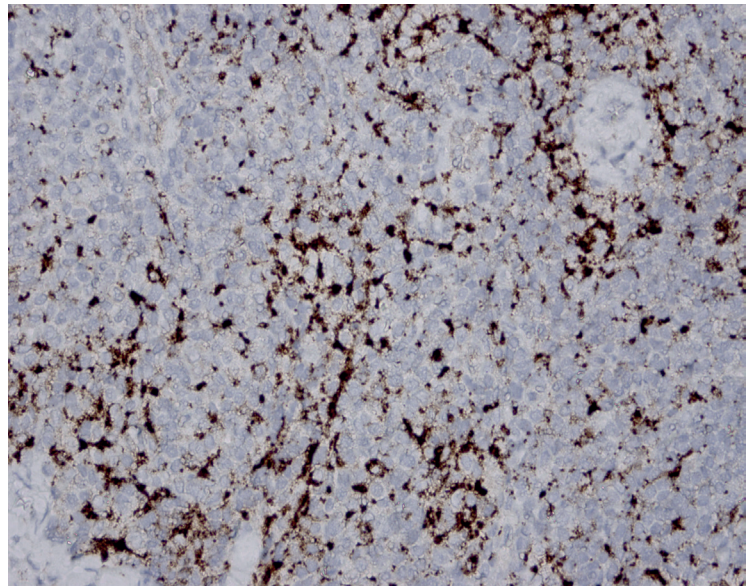
<sup>3</sup> Servicio de Medicina Interna, Hospital Básico Atuntaqui. Atuntaqui, Ecuador.

<sup>4</sup> Servicio de Terapia Intensiva, Hospital General Ibarra. Ibarra, Ecuador.



**Figure 1.** Emperipolesis in cervical lymph node stained with hematoxylin and eosin.

**Figure 2.** Immunohistochemistry of cervical lymph node, where the dark brown stained cells are Histiocytes(positive CD68 marker).



dren and young adults, with slight predominance in men over women and in African descendants in comparison with other races. This disorder was described for the first time in 1965 by Paul Destombes who reported 2 cases of adenitis with lipid deposits; then, Juan Rosai and Ronald Dorfman identified the diseases as sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy and submitted it to a unique clinical-pathological entity with 2 studies published in 1969 and 1972. Histologically, abnormal xanthomatous histiocytes of the Rosai-Dorfman disease show abundant emperipolesis of erythrocytes, lymphocytes, polynuclear and plasmatic cells, which implies immersion of these types of cells which remain intact within cytoplasm<sup>3, 4</sup>.

Abnormal histiocytes are immunoreactive for CD14, CD68, CD163 and S100 and negative for CD1a and CD207<sup>5, 6, 7</sup>.

Emperipolesis was described in 1956 by Humble as "the active penetration of a cell by another which remains intact". In these cases, the comprised cell maintains the integrity of the normal structure inside the other cell, and both can exist without causing abnormalities for some time. On the contrary, in phagocytosis, lysosomal enzymes destroy the comprised cells. Although emperipolesis is the characteristic of RDD, it may appear in other conditions such as Hodgkin lymphoma, multiple myeloma, malign melanoma, neuroblastoma and rhabdomyosarcoma<sup>8</sup>.

The hypothesis of a reactive etiology with polyclonal proliferation of histiocytes prevails in the Rosai Dorfman disease. An association with immunological diseases, hematological malignance and post-infection conditions has also been described. These cormobilities could break the migration mediated by cytokines and the activation of histiocytes<sup>9</sup>.

As per published studies, a proposal has been made that cells may represent monocytes of intermediate recruitment with differentiation block, where both alteration of homeostasis, as well as inherent genomic alterations could contribute to the initiation of the disorder through transduction of signals, playing a vital role in the development of this pathology, different inflammatory molecules such as the stimulating factor of colonies of macrophages, IL-1 $\beta$ , IL-6 and tumoral- $\alpha$  necrosis factor<sup>10</sup>.

In the current classification of histiocytosis, Rosai-Dorfman Disease is in the group of the R-group histiocytosis, comprised of:

Family Rosai Dorfman Disease, Classic Rosai Dorfman Disease (nodal), Extranodal Rosai Dorfman Disease, Rosai Dorfman Diseases associated with neoplasia, Rosai Dorfman Disease associated with immune pathology, other non-C non-L non-M non-H histiocytosis<sup>11</sup>.

The diagnosis in the patient with the Rosai-Dorfman Di-

sease should include detection tests of EBV, cytomegalovirus, HHV-6, HHV-8 and VIH. Also, rheumatoid factor, a test of anti-nuclear antibodies, complete hemograms, liver and renal function, levels of immunoglobulins and a globular sedimentation velocity. A total of 90% of patients have been reported to have an elevated globular sedimentation velocity and polyclonal hypergammaglobulinaemia with an inversion of albumin relation: globulin. Also, leukocytosis with neutrophilia, normocytic normochromic anemia, a positive value of rheumatoid factor or of antinuclear antibodies may be found. Hemolytic anemia and eosinophilia are rare. Ideally, an excisional biopsy may be performed to obtain appropriate tissue for morphological and immunohistochemical analysis for a diagnosis<sup>12</sup>.

The differential diagnosis of the Rosai-Dorfman Disease is wide and it is similar to other causes of non-malign lymphadenopathy, etiologies include tuberculosis, Wegener granulomatosis, sarcoidosis, disease related to IgG4, juvenile xanthogranuloma, Erdheim-Chester disease, Gaucher disease and other histiocytic disorders such as histiocytosis of Langerhans cells. Malign etiologies in differential diagnosis include Hodgkin lymphoma, non-Hodgkin lymphoma, leukemia, melanoma, Langerhans cell sarcoma<sup>13</sup>.

Observation or surgical resection is sufficient in many patients. If this is not possible or in the event of relapse, the above described treatment is diverse and with the years, the best option for each specific case has been described<sup>14</sup>. Systemic treatments are necessary in the event of compressive, lithic oral-obstructing compromise, particularly in bone disorders<sup>15</sup>. At present, the current therapeutic options are: First line therapy: observation, steroids, surgery, sirolimus; second line therapy: radiotherapy, cladribine, clofarabine, imatinib, rituximab, azatioprina, 6 oral mercaptopurine, metotrexate, interferon alpha, thalidomide<sup>16</sup>. Other systemic therapies include combinations such as CVP ( cyclophosphamide, vincristine, prednisone) and 6 mercaptopurine with prednisone<sup>17</sup>.

## Conclusions

To conclude, the different possible diagnoses in cervical lymphadenopathy are many, and since there is no clinical or paraclinic history, biopsy is a diagnostic tool in the event of suspected malignancy and/or rare diseases. The Rosai Dorfman Disease should be considered among the possible diagnoses, reporting a self-limited case without the need of using systemic therapies.

## Bibliographic references

1. Gaddey HL, Riegel AM. Unexplained lymphadenopathy: evaluation and differential diagnosis. *Am Fam Physician*. 2016 [quoted Jun 12 2018]; 94(11):896-903. Available at: <https://www.aafp.org/afp/2016/1201/p896.pdf>
2. Haroche J, Emile JF. Systemic histiocytosis. EMC - Tratado de Medicina. 2017 [quoted Jun 2 2018]; 21(2):[Approx 4 p.]. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1636541017842501>
3. Durham BH. Molecular characterization of the histiocytoses: Neoplasia of dendritic cells and macrophages. *Semin Cell Dev Biol*. 2018 [quoted Apr 6 2018]; [Approx 15 p.]. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952117303646?via%3Dihub>
4. Zougrana-Ouattara C, Ouedraogo F, Toguyéni L, Kalmogho A, Yonaba C, Bouda CG, et al. The Destombes-Rosai-Dorfman Disease or sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy: a rare case described in the Paediatrics Department of Yalgado

- Ouedraogo University Hospital. *Open Journal of Pediatrics*. 2017 [quoted Apr 25 2018]; 7:345-52. Available at: [http://file.scirp.org/pdf/OJPed\\_2017122016222405.pdf](http://file.scirp.org/pdf/OJPed_2017122016222405.pdf)
5. Vokuhl C, Oeschlies I, Klapper W, Leuschner I. Histiocytic diseases in childhood and adolescence. *Pathologie*. 2015 [quoted Apr 7 2018]; 36:443-50. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00292-015-0043-x>
6. Emile JF, Charlotte F, Chassagne-Clement C, Copin MC, Fraitag S, Mokhtari K, et al. Histiocytoses: general classification and molecular criteria. *La Presse Médicale*. 2017 [quoted Apr 7 2018]; 46(1):46-54. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0755498216000476?via%3Dihub>
7. Egan C, Jaffe ES. Non-neoplastic histiocytic and dendritic cell disorders in lymph nodes. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2018 [quoted Apr 6 2018]; 35(1): 20-33. Available at: [https://ac.els-cdn.com/S0740257017301247/1-s2.0-S0740257017301247-main.pdf?\\_tid=49a0038f-e079-4e74-be87-69e624cd6530&acdnat=1523071678\\_5bfc28bc70d49a0605d6c15767960cd9](https://ac.els-cdn.com/S0740257017301247/1-s2.0-S0740257017301247-main.pdf?_tid=49a0038f-e079-4e74-be87-69e624cd6530&acdnat=1523071678_5bfc28bc70d49a0605d6c15767960cd9)
8. Piris MA, Aguirregoicoa E, Montes-Moreno S, Celeiro-Muñoz C. Castleman Disease and Rosai-Dorfman Disease. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2018 [quoted Apr 5 2018]; 35(1), 44-53. Available at: [https://ac.els-cdn.com/S074025701730148X/1-s2.0-S074025701730148X-main.pdf?\\_tid=38141e47-771c-4599-abad-ff6bb1033ead&acdnat=1522985835\\_e16f-4ba49e375d4c9f4f6a2e2a8f1390](https://ac.els-cdn.com/S074025701730148X/1-s2.0-S074025701730148X-main.pdf?_tid=38141e47-771c-4599-abad-ff6bb1033ead&acdnat=1522985835_e16f-4ba49e375d4c9f4f6a2e2a8f1390)
9. Luder C, Nordmann T, Ramelyte E, Mühleisen B, Kerl K, Guenova E, et al. Histiocytosis – cutaneous manifestations of hematopoietic neoplasm and non neoplastic histiocytic proliferations. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018 [quoted Apr 5 2018]; 32: 926-34. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jdv.14794>
10. Cai Y, Shi Z, Bai Y. Review of Rosai-Dorfman Disease: New insights into the pathogenesis of this rare disorder. *Acta Haematol*. 2017 [quoted Apr 5 2018]; 138:14-23. Available at: <https://www.karger.com/Article/Abstract/475588>
11. Emile J, Abla O, Fraitag S, Horne A, Haroche J, Donadieu J, et al. Revised classification of histiocytoses and neoplasms of the macrophage-dendritic cell lineages. *Blood*. 2016 [quoted Apr 6 2018]; 127(22):2672-81. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/127/22/2672.full.pdf>
12. Bösmüller H, Nann D, Horger M, Fend F. Erdheim-Chester disease and Rosai-Dorfman disease. Pathological, radiological and clinical features of adult non-Langerhans cell histiocytosis. *Pathologie*. 2015 [quoted Apr 5 2018]; 36:458-65. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00292-015-0057-4>
13. Dalia S, Sagatys E, Sokol L, Kubal T. Rosai-Dorfman Disease: tumor biology, clinical features, pathology, and treatment. *Cancer Control* 2014 [quoted Apr 5 2018]; 21(4):322-7. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/107327481402100408>
14. Classen CF, Minkov M, Lehrnbecher T. The non-Langerhans cell histiocytoses (rare histiocytoses) – Clinical aspects and therapeutic approaches. *Klin Padiatr*. 2016 [quoted Apr 7 2018]; 228:294-306. Available at: <https://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0042-109713>
15. Cohen Aubart F, Haroche J, Emile JF, Charlotte F, Barete S, Schleinitz N, et al. Rosai-Dorfman disease: diagnosis and therapeutic challenges. *La Revue de Médecine Interne*. 2018 [quoted Apr 4 2018]; [Approx 6 p.]. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S024886631830047X?via%3Dihub>
16. Haroche J, Cohen-Aubart F, Rollins BJ, Donadieu J, Charlotte F, Idbah A, et al. *The Lancet Oncology*. 2017 (quoted 6 abril 2018); 18 (2): e 113-e125.
17. Goyal G, Ravindran A, Patnaik MM, Nowakowski GS, Thanarajasingam G, Habermann TM, et al. Clinical features and treatment approaches in patients with Rosai-Dorfman Disease: The Mayo Clinic experience. *Blood*. 2017 [quoted Apr 4 2018]; 130(Suppl 1):3573. [Approx. 6 p.]. Available at: [http://www.bloodjournal.org/content/130/Suppl\\_1/3573](http://www.bloodjournal.org/content/130/Suppl_1/3573)

Recibido: 20 june 2018

Aprobado: 22 july 2018

## REVIEW / ARTÍCULO DE REVISIÓN

# La farmacogenómica en el desarrollo de la inmunoterapia específica de alérgenos y autoantígenos.

## The pharmacogenomic in the development of the autoantigen- and allergen- specific immunotherapy.

Mainet-González D.

DOI. [10.21931/RB/2018.03.03.9](https://doi.org/10.21931/RB/2018.03.03.9)

**Resumen:** Las enfermedades alérgicas y autoinmune son frecuentes en la población, afectan su calidad de vida y pueden provocar la muerte. Las enfermedades alérgicas son una respuesta exagerada a antígenos extraños inocuos y las autoinmune, a los antígenos propios. La inmunoterapia de antígeno específico ha logrado disminuir los síntomas, el consumo de medicamentos y la evolución a formas más graves de las enfermedades alérgicas. Esta enfermedad tratada con esa inmunoterapia ha sido estudiada con algunas técnicas farmacogenómicas en muestras de sangre, células mononucleares de sangre periférica y algunos tejidos con los objetivos de: predecir una respuesta clínica eficaz, en seleccionar a los pacientes que sean posibles respondedores, en determinar las dosis óptimas para esta terapéutica, en buscar combinaciones con otros medicamentos y en estudiar los mecanismos de acción de las diferentes vías de administración de antígenos. Sin embargo, esta inmunoterapia en las enfermedades autoinmune no ha alcanzado buenos resultados a nivel de ensayo clínico como en los estudios preclínicos. A partir de las diferentes aplicaciones de la farmacogenómica en la inmunoterapia de antígeno específico principalmente de las enfermedades alérgicas se hacen algunas consideraciones, que favorezcan una transición óptima de los candidatos más efectivos a ser vacuna en la práctica clínica de las enfermedades autoinmune.

**Palabras Claves:** genómica, expresión de genes, vacuna o inmunoterapia antígeno específica, diagnosticadores, alergia y autoinmunidad.

**Abstract:** Allergic and autoimmune diseases are very frequent in the population, affect his life quality and can provoke death. Allergies are an extraordinary response to undamaged strange antigen and autoimmune diseases, itself antigen. The antigen-specific immunotherapy has gotten to decrease symptoms, the drug consumes and produces a way less dangerous of allergic disease. This illness treated with this immunotherapy has been studied with some pharmacogenomic techniques in blood samples, peripheral blood mononuclear cells, and several tissues for the following objectives: to predict a efficient clinical response, to select highly probable patients that response to the treatment, to determine the optimum dosage or therapeutic schedule, to looking for a new combinations with other treatments, and to study the action mechanism of the different ways to administrate antigens. However, this immunotherapy has not got as good results in the autoimmune-disease clinical trials as preclinical studies. In this paper, some recommendations and suggestions are written after to explain the different applications of the pharmacogenomic researches of the antigen-specific immunotherapy in the allergic disease that permit a good transition of the most effective vaccine candidate to clinical practice of autoimmune diseases.

**KeyWords:** genomic, gene expression, antigen-specific immunotherapy or vaccine, biomarker, allergy and autoimmunity.

### Introducción

Las enfermedades alérgicas afectan desde un 10 al 40 % de la población de los países industrializados según la región geográfica<sup>1</sup> y a Cuba<sup>2</sup> y las enfermedades autoinmunes, de 7,6 a 9,4 % de la población<sup>3</sup>. En ambas enfermedades ocurre una respuesta inmune inflamatoria exagerada a antígenos que son inocuos. En las primeras, esos antígenos son extraños al organismo (alérgenos) y en las segundas, contra antígenos propios del organismo (autoantígenos). Las enfermedades alérgicas son menos heterogéneas que las enfermedades autoinmunes. En las primeras, el antígeno diana causante principal de la enfermedad generalmente es conocido, y en las segundas, no se logra identificar esa diana. La inmunopatogénesis de las enfermedades autoinmune está asociada con una expansión epitópica y un daño tisular más importante que las enfermedades alérgicas antes que el diagnóstico se haya completado. En ambas enfermedades está indicado el tratamiento para aliviar los síntomas y el empleo

de antiinflamatorios inespecíficos. Sin embargo, la inmunoterapia de antígeno específico (ITAE) juega un papel primordial ya que es capaz de alterar el curso natural de ambas enfermedades.

La ITAE ha sido efectiva en la alergia a picadura de abejas, al ácaro de polvo doméstico, la caspa de mascotas y al polen por vía de administración sublingual o subcutánea. La primera vía es mucho más segura, lo cual favorece la administración por el mismo paciente en su domicilio<sup>4,5</sup>. Ese tratamiento ha logrado en las enfermedades alérgicas mantener su efecto después de retirado con una remisión larga de los síntomas, previene de nuevas sensibilizaciones a otros alérgenos y disminuye la posibilidad de progresión a formas clínicas más graves de esa enfermedad. Por ejemplo, los pacientes con rinitis alérgicas no lleguen a padecer de asma o anafilaxia. Este tratamiento indicado en los inicios de la enfermedad es mejor para evitar la expansión epitópica o polisensibilización a varios alérgenos. También puede

<sup>1</sup> Departamento de Farmacogenómica, Subdirección de Investigaciones Biomédicas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Apartado 6162, La Habana, Código postal 10600, Cuba.



llegar a tener un perfil de seguridad y costo-beneficio mejor que los fármacos inmunosupresores inespecíficos o aliviadores de síntomas. En este tratamiento es importante identificar el alérgeno causal clínicamente más relevante para pacientes mono- como polisensibilizados por la historia clínica y los exámenes complementarios.

Los objetivos fundamentales de desarrollo de la ITAE es aumentar la seguridad mediante nuevos esquemas de tratamiento que disminuyen el tiempo de escalamiento gradual de la dosis, consiga una mayor adherencia del paciente al tratamiento y mejoren la efectividad en la inducción de inmunotolerancia. La tolerancia clínica es un estado de no respuesta inmune específica contra antígenos inocuos extraños o propios sin desencadenar síntomas durante largo período de tiempo mediante el aumento del umbral de activación de las células efectoras y cambios en la función de las células T y B de memoria específicas de antígeno<sup>6</sup>. La ITAE ha tenido buenos resultados en los estudios preclínicos con animales modelos de enfermedades autoinmunes, pero no ha logrado esos éxitos en los ensayos clínicos. A excepción de la enfermedad celíaca, que tiene un candidato en ensayo clínico entre la fase I y II; cuyo antígeno desencadenante principal es el gluten<sup>7</sup>.

La farmacogenómica es una parte de la farmacogenética que estudia la influencia de muchos genes con un enfoque sistémico o global en la respuesta al tratamiento farmacológico o inmunológico mediante tecnologías generadoras de gran cantidad de datos: la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RCPc), el microrreglo de ácido desoxirribonucleico (ADN), la secuenciación de ácido ribonucleico (ARN) y de ADN. Se ha empleado en el estudio de la ITAE en los modelos preclínicos y en los ensayos clínicos para predecir una respuesta eficaz, en la selección de los pacientes que sean posibles respondedores, en realizar una combinación sinérgicas o aditivas de varios esquemas de tratamiento, en determinar las dosis óptimas de antígeno para esta terapéutica y en el estudio de los mecanismos de acción de las diferentes vías de administración de antígeno. En esta revisión se expone las diferentes metodologías empleadas en las anteriores aplicaciones de los estudios farmacogenómicos de la ITAE principalmente en las enfermedades alérgicas y se realizan algunas recomendaciones para que esta terapéutica mejore sus resultados clínicos en las enfermedades autoinmune.

#### **Monitorear la evolución clínica y predecir la respuesta eficaz al tratamiento.**

El diagnóstico subrogado de la ITAE con el objetivo de monitorear la respuesta al tratamiento y mostrar indicios precoces de su eficacia clínica ha sido investigada en las células dendríticas y células T. En uno de los estudios de las células dendríticas se emplearon 2 estrategias complementarias para comparar los proteomas totales de las células dendríticas efectoras con las células dendríticas tolerogénicas derivada de monocitos *in vitro*: electroforesis bidimensional y espectrometría libre de marcaje<sup>8</sup>. Los genes diferencialmente expresados fueron confirmados como diagnosticadores posibles en la RCPc en sangre periférica y en Western Blot en una muestra de 79 pacientes. Se identificaron 6 genes relacionados con las células dendríticas efectoras tipo 1 (DC1, favorece la diferenciación de las células T auxiliares de tipo 1) y DC17 (favorece la diferenciación de las células T auxiliares de tipo 17), y 8 genes relacionados con las células dendríticas regulatorias (DCreg). De los primeros tipos de células no se descubrió ningún gen relacionado con la eficacia clínica. Sin embargo, del segundo grupo de células se descubrieron dos genes: C1Q (gen del componente 1 del complemento) y STAB1 (gen del recep-

tor de lipoproteína de baja densidad). La expresión de esos dos genes aumentó en los pacientes respondedores clínicos y no así, en los pacientes no respondedores o tratados como placebo. En el análisis de curva ROC (siglas del inglés, características operacionales del receptor) de esos dos genes se obtuvo un área bajo la curva entre 0,71 a 0,77 ( $p < 0.05$ ) para el gen C1Q (gen de las subunidades A, B, C del subcomponente C1q del complemento) y 0,71 para el gen STAB1 ( $p = 0,0187$ ).

En otro ensayo similar se comparó el perfil transcriptómico y el proteómico de células dendríticas derivadas de monocitos y polarizadas *in vitro* hacia las DC1, hacia las células dendríticas tipo 2 (DC2, favorece la diferenciación de células T auxiliares tipo 2) y hacia DCreg mediante microarreglo amplio del genoma a partir de ADN complementario y proteómica cuantitativa libre de etiquetado, respectivamente<sup>9</sup>. Los genes diferencialmente regulados en DC2 y DCreg fueron evaluados por medio de la RCPc en células mononucleares de sangre periférica de 80 pacientes con alergia al polen de hierba antes y después de 2 a 4 meses de ITAE sublingual, en paralelo con el índice de síntomas de la rinoconjuntivitis. Los genes asociados con DC2: CD141 (gen de la trombomodulina, THBD), GATA3 (gen de la proteína 3 de unión GATA), y RIPK4 (gen de la proteína quinasa serina /treonina 4 de interacción con el receptor) fueron infraexpresado concomitantemente con una sobreexpresión de los genes asociados a las células DCreg: C1QA y FCGR3A [gen del receptor IIIA del fragmento Fc de la inmunoglobulina (Ig) G] en sangre de respondedores clínicos y no ocurrió así en los no respondedores. Esos cambios genéticos fueron mejor correlacionados con un beneficio clínico que las alteraciones de las células T CD4+ específica de alérgeno o la respuesta de IgG. La combinación de esos 5 genes expresados en células dendríticas sanguíneas: C1Q, CD141, FCGR3A, GATA3, y RIPK4 (estos tres últimos existentes también en las células linfoides) y conjuntamente con el gen de STAB1 del estudio anterior son posibles diagnosticadores; que reflejan los cambios en el balance regulatorio proalérgico en sangre periférica, permiten monitorear temprano (2 meses) el inicio de la eficacia de ITAE y ser predictivos de la tolerancia clínica. De estos dos estudios independientes sólo el gen C1QA ha sido reproducible.

La búsqueda de diagnosticadores subrogados de eficacia clínica se ha realizado en las células T auxiliares (CD4+) periféricas específicas de polen de hierba (alérgenos *Phl p 1* y *Phl p 5*) provenientes de células mononucleares de sangre periféricas antes, a los 2 meses y a los 4 meses de tratamiento.<sup>10</sup> Aunque se logró un mejoramiento de los síntomas en un 29,2 % de los pacientes que recibieron tabletas de ITAE, la disminución de la expresión de los genes de las citoquinas interleucina-4 o IL-4 (IL4) e IL-10 (IL10) mediante la RCPc y de la secreción de la citoquina IL-10 en los pacientes ( $p < 0.001$ ) fue sin correlación con un beneficio clínico. Se concluyó que los cambios detectados en esas células T auxiliares no son diagnosticadores de eficacia temprana del mejoramiento clínico de los pacientes. Sin embargo, en otro estudio los niveles de expresión de los genes de IL17 y RORC (gen del receptor C huérfano del receptor de ácido retinoico) fueron determinados por la RCPc de ARN total extraído de las células mononucleares periféricas *in vivo* y *ex vivo*<sup>11</sup>. Los niveles de expresión de esos genes fueron altos en los pacientes alérgicos no tratados con respecto a los sanos voluntarios y disminuyeron con la ITAE aunque no llegaron a los niveles de los individuos sanos. Esa disminución fue detectada también en las proteínas de los genes de IL17 y sus genes asociados (IL6 e IL23) en un inmunoensayo enzimático en plasma. También se observó una correlación positiva entre los niveles de ARN mensajero y las proteínas del gen de IL17

con el puntaje de síntomas alérgicos<sup>11, 12</sup>. Las frecuencias de células T auxiliares de tipo 17 disminuyeron y de las células T auxiliares secretoras de la citoquina IL-10 aumentaron después de la ITAE con respecto antes de recibir tratamiento. Por todo lo anterior, se concluyó que la ITAE inhibe la inflamación mediada por las células T auxiliares tipo 17 en la rinitis alérgica a ácaros de polvo doméstico y que la determinación de la expresión génica de la IL17 es un diagnosticador posible de la severidad de la enfermedad y del efecto de la ITAE a los dos años de tratamiento.

### Selección de pacientes posibles respondedores

Los diagnosticadores predictivos son aquellos que permiten incluir aquellos pacientes que responderán al tratamiento o excluir aquellos que no se beneficiarán de la ITAE. Se ha empleado en las enfermedades alérgicas alimentarias de aquellos individuos que comparten los antígenos leucocitarios de histocompatibilidad tipo II (HLA, de sus siglas en inglés): HLA DR4+ y HLA DR15+<sup>13</sup>. Ese diagnóstico también se ha aplicado en las enfermedades celíacas y en la esclerosis múltiple. Estas dos enfermedades autoinmunes tienen una causa poligénica multifactorial con un riesgo genético altamente relacionado con los genes de HLA tipo II. Los individuos celíacos del ensayo con el candidato inmunoterapéutico Nervax 2 (Immusan T, Massachusetts, Estados Unidos de América) fueron incluidos en una de las tres cohortes de acuerdo si son homocigotos o no para los genes codificantes DQA1\*05 y DQB1\*02<sup>14</sup>. Los alelos DQA1 y DQB1 codifican la proteína heterodimérica alfa beta que reside en las células presentadoras de antígeno y facilita la interacción con el receptor de las células T CD4+ y el péptido de gluten. Estos genes representan entre el 80 y 90 % de los pacientes celíacos en la población de Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos y también de Cuba<sup>15</sup>. Ese genotipaje es realizado en la RCP mediante el empleo de cebadores específicos de cada uno de las secuencias de esos alelos. Además de ese genotipaje se realizó la determinación *in vitro* de la actividad de células T específicas de los pacientes mediante un inmunoensayo enzimático de interferón gamma en sangre después de un desafío con los péptidos constituyentes de la vacuna<sup>16</sup>.

Los enfermos de esclerosis múltiple secundaria progresiva seleccionados en un ensayo con ITAE intradérmica de una mezcla de 4 péptidos de la proteína básica de mielina ATX-MS-1467 (Bubendorf, Suiza) tienen los alelos DRB1\*01, 04, 07, 11, 13, 14, y 15<sup>17</sup>. Esos alelos constituyen un 77% de frecuencia del haplotipo caucásico y tienen una asociación de susceptibilidad con esta enfermedad. Los alelos de HLA-DRB1 fueron diagnosticados por el genotipaje de baja resolución mediante la RCP de polimorfismo de conformación de cadena simple estándar en ADN extraído de leucocitos sanguíneos periféricos. En el caso de Cuba, se ha logrado identificar una susceptibilidad a esta enfermedad en los alelos DRB1\*15 y 14 y DQA1\*01 y DQB1\*06 y una asociación de protección en el alelo DRB1\*11 con la esclerosis múltiple<sup>18</sup>. Se concluyó que esos dos candidatos a vacunas son seguros y que el primero fue efectivo en reprogramar las células T CD4+ al evitar la inflamación de las células intestinales después de varios desafíos de los pacientes al gluten.

### Favorecer el estudio de la combinación de medicamentos

Se evaluó el efecto de las células B sobre las células dendríticas a través de la expresión del gen tromboespondina-1 (TSP1) en producir tolerancia en un modelo animal de alergia alimentaria a ovoalbúmina y como la ITAE se puede combinar con un tratamiento antiIL-13 para mejorar ese proceso<sup>19</sup>. El ARN total fue aislado de las células del intestino, bazo y

nódulos mesentéricos de los ratones sometidos al tratamiento por vía oral y a la inyección 48 horas después del inicio del ITAE con un antagonista antiIL-13. Se obtuvo ADN complementario donde se analizó la expresión de TSP1 en la RCPc. También, se realizó Western Blot y la RCP específica de metilación de ese gen. La exposición a la citoquina IL-13 inhibió la expresión de TSP1 en células B, y mejoró la metilación de ADN del gen TSP1. El tratamiento de los ratones con alergia alimentaria con la combinación de ITAE y antagonistas antiIL-13 restauró la generación de células dendríticas tolerogénicas y mejoró el efecto terapéutico de la inmunoterapia. Las células B fueron requeridas en la generación de células dendríticas productoras del factor de crecimiento transformante beta o TGF beta. La TSP1 derivada de células B convirtió el TGF beta latente en activo en las células dendríticas por una reacción proteolítica.

### Estudio de las dosis óptimas de la inmunoterapia de antígeno específico.

A los niños con rinitis alérgica de un ensayo clínico se dividieron en tres grupos de dosis acumulativa semanal: 200 000 SQ-U, 24 000 SQ-U y 0 SQ-U (placebo) de una mezcla glicerizada de polen de abedul, avellana y aliso (ALK-Abello, Hørsholm, Dinamarca) por vía sublingual<sup>12</sup>. De su sangre periférica se le extrajo las células mononucleares antes, al año y a los 2 años de tratamiento que fueron estimuladas *in vitro* con derivados de las proteínas purificadas del *Mycobacterium tuberculosis*, con el alérgeno y otro grupo no fue estimulada. De esas células se extrajo el ARN mensajero en lo que se estudiaron los genes siguientes en la RCPc: IL17, IL23, IL27, FOXP3 (factor de transcripción regulador de desarrollo de las células T regulatoria), IL10 y TGFB1 (gen del factor de crecimiento transformante beta). La expresión del gen de IL17 inducida por el alérgeno fue significativamente aumentada en los pacientes con una alta puntuación combinada de síntomas y medicamentos (parámetro que se incrementa por cada síntoma y su intensidad y tipos de medicamentos administrados) de dos años. También, existió correlación positiva entre los niveles de expresión del gen de IL17 y esa puntuación en el grupo total de estudio y fundamentalmente con el grupo tratado con mayor dosis al cabo de 2 años ( $r=0,74$ ;  $p=0,027$ ). La expresión del gen FOXP3 inducida por el alérgeno fue significativamente aumentada en el grupo tratado con la máxima dosis acumulativa semanal después de 2 años de estudios cuando se compara con antes de recibir tratamiento ( $p=0,016$ ) y con el grupo placebo ( $p=0,028$ ). Se encontró una correlación en la expresión de los genes IL10 y TGFB1 con el gen FOXP3 en el estudio total. Este último gen está relacionado con las células T regulatorias específicas de alérgeno que también aumentaron durante el tratamiento.

En un estudio preclínico en ratones transgénicos con encefalitis autoinmune experimental que constituye un modelo de estudio de la esclerosis múltiple se evaluó como el escalamiento de las dosis de la ITAE subcutánea (0,08; 0,8; 8; 80 y 800  $\mu$ g de proteína básica de mielina) influye en los perfiles transcripcionales e inmunológicos de las células T auxiliares<sup>20</sup>. Se realizó microarreglos de ADN a las células T auxiliares aisladas y luego, se confirmaron sus hallazgos con la RCPc. También se realizó análisis de citometría de flujo y de proliferación celular. A partir de 8  $\mu$ g de antígeno se produce anergia proliferativa y disminuyen las citoquinas asociadas con las células T auxiliares de tipo 2 (IL-2 e interferón gamma). Mediante un análisis multivariado de datos para agrupamientos de genes, visualización y análisis de componentes principales se reveló una progresiva supresión de transcritos que regulan positivamente

Las funciones efectoras inflamatorias y reprimen las vías del ciclo celular. Los genes de los factores de transcripción: CMIP (gen de la proteína inductora de c-maf) y NFIL3 (gen del factor nuclear regulado de la proteína IL-3) aumentaron su expresión al igual que los genes de las moléculas coestimuladoras negativas: LAG3 (gen 3 de activación de linfocitos), TIGIT (gen del inmunoreceptor de células T con dominio de Ig y motivo inhibitorio basado en tirosina), y HAVCR2 (gen del receptor celular 2 del virus de hepatitis A) a nivel de ARN mensajero y proteína. Esas moléculas caracterizan a las células T auxiliares regulatorias y su expresión correlaciona con la citoquina inmunoregulatoria IL-10. Estos patrones de expresión de transcritos coordinados y específicos de estadios evolutivos suministran una racionalidad en el escalado de dosis del ITAE que permita minimizar los riesgos asociados con la administración tanto profiláctica como terapéutica de esa vacuna y lograr una modulación sostenida de esas células T auxiliares específicas de antígeno.

### Descubrir el mecanismo de acción de la inmunoterapia de antígeno específico

El mecanismo clave de esta inmunoterapia es lograr la tolerancia periférica sostenida mediante la presentación antigénica en un contexto no inflamatorio. Las células T CD4+ requiere de tres señales cuando interactúa con las células presentadoras de antígenos: 1) una señal de especificidad para la unión del receptor de célula T CD4+ con un péptido antigénico corto presentado por el complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 (MHCII), 2) una señal de coestimulación negativa suministrada por un número diferente de pares de ligando-receptor sobreexpresado en un ambiente no inflamatorio y 3) una señal de regulación mediante citoquinas inhibitorias<sup>21</sup>. Esas tres señales genera células T anérgicas, apoptosis de células T CD4+ efectoras o la generación de células T regulatorias. Si la ITAE actúa a nivel de las células T vírgenes de contacto con el antígeno se favorece la apoptosis de aquellas que son específicas para los péptidos de la vacuna o induce la diferenciación de las células T regulatorias. Esas células T regulatorias inhiben las células T memorias efectoras patogénicas y además, suprimen la diferenciación de otras células T vírgenes que reconocen otros antígenos propios liberados como resultados de un daño tisular y evitan así, la expansión epitópica. Si la vacuna influye directamente a nivel de las células T de memoria promueve la apoptosis y su anergia<sup>22</sup>. También, es importante la dosis de antígeno para inducir tolerancia. A bajas dosis se favorece la anergia mientras la exposición crónica y repetida a altas dosis de ese antígeno se favorece la conversión de células T efectoras altamente diferenciadas en células T regulatorias secretoras de la citoquina IL-10 de cada fenotipo (T auxiliares de tipo 1, 2 y 17). Por eso se recomienda realizar esquema de incremento gradual de dosis. Primero, se comienza con bajas dosis de antígeno y se incrementa hasta llegar a una alta dosis de mantenimiento donde se logra la inmunosupresión sin la posibilidad de efectos colaterales peligrosos. Con ese estímulo inicial de alta dosis antigénica pudiera ocurrir la activación y proliferación de células T CD4+ y la concomitante liberación excesiva de citoquinas.

El fenómeno de tolerancia periférica es un proceso multipaso donde participan órganos linfoides y tejidos periféricos<sup>23</sup>. Primero, ocurre la migración de las células dendríticas cargadas de antígenos de la lámina propia hacia los nódulos linfáticos locales. En estos nódulos las células estromales y las células dendríticas inducen la expresión de los receptores de localización en las células T específicas a antígenos y, además, favorecen su diferenciación en células T regulatorias FOXP3+

inducida y dependiente TGF beta. Estas células regulatorias inducidas regresan a la lámina propia periférica donde se expanden bajo la influencia de los macrófagos secretores de la citoquina IL-10. Algunas de esas células T regulatorias pasan de ese tejido periférico por vía linfática o sanguínea a diseminarse a través del sistema inmune y promueven la tolerancia local a nivel sistémico.

Todos los genes mencionados en esta revisión fueron confirmados por otra técnica independiente a la que se obtuvo su descubrimiento y pueden ser recogidos en cinco mecanismos por el orden de aparición una vez comenzada la administración de este tratamiento: a) la existencia de un ambiente protolerogénico y adyuvante en el sitio de administración de la ITAE, b) los efectos de desensibilización muy temprano (de horas a días) relacionados con células efectoras: los basófilos y las células B, c) los efectos de desensibilización temprano (a los pocos meses) relacionados con las células presentadoras de antígeno, d) los efectos intermedios de inducción de tolerancia (de meses a 2 años) en las células T periféricas, e) los efectos tardíos de inducción de tolerancia (de 2 a 4 años) en la generación de células B regulatorias (tabla 1 y figura 1). De esos procesos principales en el mecanismo de la ITAE se explicarán a continuación la existencia de un ambiente tolerogénico en la vía de administración y la desensibilización mediada por los basófilos, las células T y las células B.

Con el objetivo de estudiar el microambiente de citoquinas y la expresión de estructuras dianas para adyuvantes en la región sublingual, tejido gingival y bucovestibular de la mucosa oral con respecto a la piel se recogió muestras de biopsias y raspado oral de 20 individuos antes de las 24 horas después de muerto<sup>24</sup>. Se evaluó la expresión de genes en la RCPc de las células T auxiliadoras tipo 1 (TBX21 o gen del factor de transcripción de diferenciación de este tipo de células T e IFNG o gen del interferón gamma); tipo 2 (GATA3 e IL4); tipo 17 (IL17A, IL17F, IL22, IL6, IL16, CCL20 o gen del ligando 20 de quemoquina tipo CC y RORC) y tipo regulatoria (FOXP3, IL10 y TGFB1) y las células dendríticas (TLR2 y TLR4, o genes de los receptores 2 y 4 parecidos a Toll). También se analizó las proteínas expresadas de esos genes en citometría de flujo e inmunohistoquímica. Descubrieron que la región vestibular y sublingual de la mucosa oral tienen propiedades protolerogénicas. Ambas regiones forman un microambiente de células T auxiliadoras tipo 1 predominante con respecto a la presencia de células T auxiliadoras tipo 2 que no fue detectada en ninguno de los sitios estudiados. También existe un microambiente de células T auxiliadoras tipo 17 de protección contra la actividad microbiana. Existe gran número de células dendríticas en la mucosa oral donde se detecta una gran expresión de receptores de esas células (TLR2 y TLR4), más en la región vestibular que en la región sublingual; que pueden emplearse como estructuras dianas de adyuvantes. Por tanto, la región vestibular puede ser un sitio de administración alternativo y atractivo de vacunas que usen la mucosa oral.

En dos estudios se mejora la comprensión de los basófilos sanguíneos en el mecanismo temprano de desensibilización alérgica de la ITAE subcutánea. De los pacientes con rinitis alérgica tratados con la ITAE de extracto alérgico *Der p1* Depigoid (Leti, Madrid, España) y los controles enlazados por edad y sexo se recogió muestra de sangre periférica antes del tratamiento y 4 horas después<sup>25</sup>. Se realizó la RCPc de los genes de la histamina N-metiltransferasa (HNMT) y la triptasa alfa/beta 1 (TSPAB1) que están relacionados con mediadores alérgicos. Los basófilos sanguíneos de los pacientes bajo tratamiento tienen un aumento de la expresión de IgE unida a receptor, el cual está correlacionado con la IgE total sérica y una disminución en la expresión génica

de HNMT y la TSPAB1 cuando se compara con los alérgicos sin esta inmunoterapia. Existe una correlación negativa significativa entre la expresión del gen HNMT y el tiempo bajo tratamiento. También, en otro estudio de los basófilos purificados de sangre periféricas de pacientes tratados con ITAE de veneno de avispa y sujetos controles, se investigó la influencia de la expresión de los genes de los receptores de histamina 1, 2 y 4 (H1R, H2R y H4R) sobre el receptor de alta afinidad de IgE y la liberación de histamina y de leucotrieno mediante la RCPc, la citometría de flujo y el inmunoensayo enzimático<sup>26</sup>. Se determinó una rápida regulación positiva del gen H2R dentro de las primeras 6 horas en la fase de inducción de la ITAE. Ese gen suprimió selectivamente la activación inducida del receptor de alta afinidad de IgE y la liberación de los mediadores químicos y también la producción de citoquina *in vitro*.

En varios estudios con respecto al efecto de desensibilización de las células T por la ITAE se sugiere que la respuesta inmune de células T auxiliaoras tipo 2 es poco modificada o es inhibida transcripcionalmente por una respuesta aumentada de células T auxiliaoras tipo 1 y la existencia de un efecto regulatorio mutuo con un equilibrio dinámico entre células T regulatorias y las células T gamma delta con la cadena variable gamma III en la rinitis alérgica antes y después de una inmunoterapia efectiva de 1 año. También se analizó el efecto de esa inmunoterapia sobre la vía de señalización de la citoquina IL-4, sobre las vías de apoptosis de esas células y la población de células T de memoria anérgicas y tolerogénicas. En el primer estudio se estudió el efecto de las dosis sobre la expresión de los genes IL18, SLAMF1 (gen de la molécula de activación linfocítica de señalización) y GATA3<sup>27</sup>. La expresión de ARN mensajero de IL18 fue aumentada en el grupo de alta dosis en comparación al placebo después de 1 año de terapia ( $p=0.028$ ) y tuvo una correlación inversa con la reacción cutánea de fase tardía en el segundo año ( $r=-0.41$ ;  $p=0.04$ ). La expresión del gen de SLAMF1 aumentó en el grupo de dosis alta desde la línea base a 1 año ( $p=0.028$ ) y correlacionó con los ARN mensajeros de IL10 ( $r=0.096$ ,  $p<0.0001$ ) y de TGFB1 ( $r=0.8$ ;  $p=0.0037$ ). No hubo cambios significativos en el ARN mensajero de GATA3. En otro ensayo clínico se estudia la expresión del gen FOXP3 y de la subfamilia de genes de la región variable del receptor de células T gamma-delta (TRVG1, TRVG2 y TRVG3) a partir de la RCPc de ARN total purificado de las células T de sangre periférica<sup>28</sup>. Los niveles de expresión del gen FOXP3 y de los genes de la subfamilia de la cadena variable gamma de los receptores de células T en los pacientes con rinitis alérgica fueron significativamente menores que en los sujetos saludables. La expresión de los genes TRVG1 y TRVG2 fue similar antes y después de la ITAE. Sin embargo, los genes FOXP3 y TRVG3 fueron significativamente mayores después de la ITAE que antes de ese tratamiento. Esos dos genes correlacionaron negativamente con la puntuación análoga visual de síntomas alérgicos (escala de 0 a 10: de mínimo a máximo malestar). Los niveles de expresión de los genes TRVG1 y TRVG2 correlacionaron positivamente con los niveles de expresión de FOXP3 antes de la ITAE. Sin embargo, los niveles de expresión de TRVG3 correlacionaron significativamente con FOXP3 antes y después de la ITAE.

Se analizó el efecto sobre los niveles de expresión de los genes del receptor soluble (sIL4R) y del receptor unido a membrana de IL4 (IL4R) en pacientes tratados con ITAE mediante la RCPc a partir de células mononucleares de sangre periférica *in vivo* y *ex vivo*<sup>29</sup>. Además, se revisaron los datos almacenados digitalmente de un microarreglo de los diferentes tipos de células T auxiliaoras 1, 2, 17 y regulatoria para evaluar la expresión de ese receptor. El ITAE produce una disminución del gen IL4R y de la citoquina IL-

4. Este receptor se encuentra representado en todas las células T auxiliaoras, pero es más abundante en las células T auxiliaoras tipo 2. Es decir, que su disminución en la expresión por el tratamiento no sólo representa una disminución a nivel molecular sino también a nivel celular. El gen sIL4R aumenta su expresión por el ITAE. Estos cambios de los genes de sIL4R e IL4R concuerdan con los obtenidos a nivel de sus respectivas proteínas en el suero de los pacientes en un inmunoensayo. El efecto inhibitorio del receptor soluble y el efecto potenciador del receptor unido a membrana en la señalización de la citoquina IL-4 es una explicación inmunológica a nivel básico y clínico novedosa del mecanismo de la ITAE en los pacientes tratados.

Se tomó células mononucleares de sangre periférica en descanso de niños con alergia alimentaria al maní tratados con ITAE oral y se aislaron las células T con moléculas de superficie CD3+. Se realizó microarreglo de ADN de esas células T y se detectó una expresión disminuida de los genes de apoptosis a los 6 meses con respecto antes de tratamiento<sup>30</sup>. Esos genes fueron: BCL2L11, GADD45A, TNFSF8 y RELA. El primero corresponde a la regulación de apoptosis mediante proteínas mitocondriales; el segundo, a la apoptosis dependiente de p53 y el tercero y el cuarto, a la vía antiapoptótica TNFs/NF-kappaB/IAP. Este resultado refleja lo que sucede para la población general de células T, pero no es lo esperado para la células T auxiliaoras tipo 2 efectoras específicas del antígeno en donde debe estar aumentada su apoptosis. Los autores sugieren que primero se realice una separación de esas células mediante complejos de tetrámeros de MHCII con los péptidos de ese alérgeno en citometría de flujo y luego, la determinación de expresión de genes.

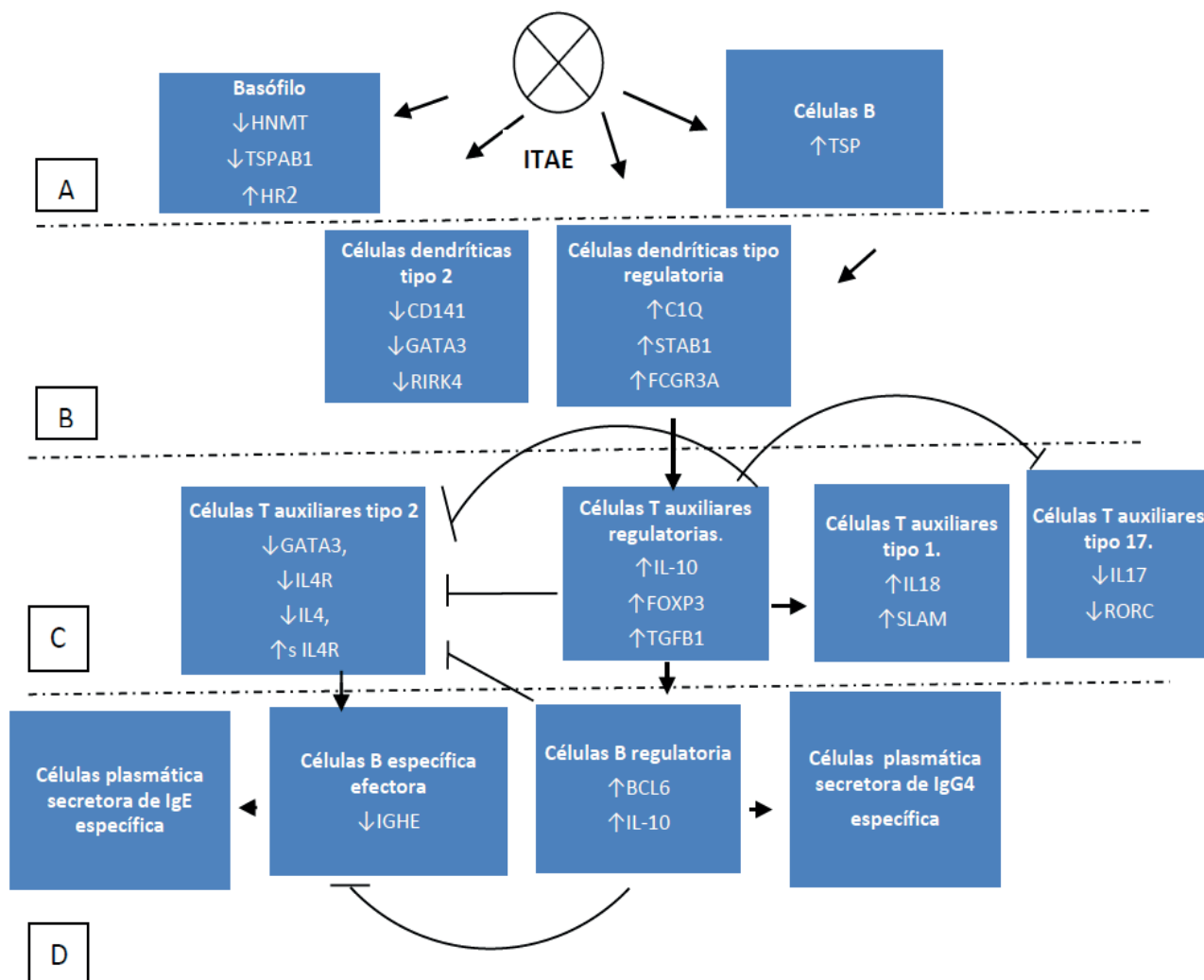
Se realizó un perfil transcripcional con alrededor de 22 genes en RCPc de alto flujo basada en la tecnología de microflujo Fluidigm Biomark System® (Fluidigm Corporation, California, Estados Unidos de América) a nivel de una simple célula separadas de monocitos de sangre periféricas de individuos alérgicos al maní por reactivos de dextrámeros de moléculas del MHCII con los péptidos del alérgeno *Ara h 2* en citometría de flujo activada por fluorescencia<sup>33</sup>. Mediante un análisis multivariado de los datos de los genes se descubrió que las células T auxiliaoras de los clones de receptores de células T diverso se expandieron en frecuencia y cambiaron de un fenotipo alérgico (IL4+/IL13+) y regulatorio (FOXP3+/CD25+/IL10+) a un fenotipo anérgico (CD28-/CD38-/IFNG-/IL3-/IL4-/IL10-) y no alérgico (IFNG+). Estos cambios fueron asociados con una disminución de los síntomas alérgicos y al desarrollo de una tolerancia inmune operacional. La administración de antígeno de manera repetida fue crítico en lograr que ese fenotipo anérgico de memoria de larga vida (CD28-/MKI67-/CD69- o con baja expresión/CD45RA con baja expresión) aumentara gradualmente sobre los demás subtipos de células T auxiliaoras y se favorezca una memoria anérgica y un ambiente tolerogénico.

La generación de células B regulatorias se producen en pacientes alérgicos tratados con la ITAE de fosfolipasa A2 (alérgeno principal de veneno de abeja) y tiene una potente supresión de la proliferación de células T CD4+ de antígeno específico y un aumento de la expresión de la IgG4<sup>31</sup>. En un ensayo preclínico de un modelo de ratón de alergia alimentaria con ovoalbúmina<sup>32</sup>. Se estudió que efecto provocaba la ITAE con ese antígeno y con el agente probiótico *Clostridium butyricum* sobre la inflamación intestinal del ratón. Se aplicó la RCPc para determinar la expresión de los genes de IL10, BCL6 (gen de la proteína 6 del linfoma de células B) e IGHE (gen de la IgE) y también se realizó Western Blot y citometría de flujo. Se comprobó *in vitro* que la células B antígeno específica del bazo del ratón tratada con la combinación

Mecanismo de acción	Células	Expresión de genes (nombre de gen*)	Función biológica**
<b>Existencia de un ambiente adyuvante y protolerogénico en el sitio de administración.</b>	Células T y dendríticas de la región sublingual, gingival y vestibular de la mucosa oral y piel	Aumento de los siguientes genes de citoquinas y factores de transcripción de la mucosa oral con respecto a la piel: a) gen de la Interleucina 10 o IL-10 (IL10), gen del factor de crecimiento transformante beta (TGFB1) y gen del factor de transcripción regulador del desarrollo y función de las células T regulatorias (FOXP3); b) gen de interferón gamma (IFNG) y gen de la proteína 21 de la caja T (TBX21); c) genes de los receptores 2 y 4 parecido a Toll (TLR2 y TLR4); d) gen de IL-17 (IL17) y gen del receptor C huérfano del receptor de ácido retinoico (RORC). No se detectaron los genes de IL-4 (IL4) ni de la proteína 3 de unión GATA (GATA3).	Los genes IL10, TGFB1 y FOXP3 están asociados a una respuesta T auxiliadora regulatoria. Los genes IFNG y TBX21 están asociados a una respuesta T auxiliadora tipo 1. El gen TBX21 codifica un factor de transcripción de diferenciación de células T auxiliadora tipo 1. Los genes IL17 y RORC están asociados con una respuesta auxiliadora tipo 17. El gen RORC codifica el factor de transcripción de diferenciación de células T auxiliadora tipo 17. Los genes IL4 y GATA3 están asociados a una respuesta T auxiliadora tipo 2. El gen GATA3 codifica un factor de transcripción de diferenciación de células T auxiliadora tipo 2.
<b>Disminución de la cantidad y función de células inflamatorias.</b>	Basófilos. Estudio <i>in vitro</i> .	Disminución del gen de la histamina N- metil transferasa, (HNMT) y del gen de la Triptasa AB1 (TSPAB1), Aumento del gen receptor de histamina 2 (H2R)	El gen HNMT codifica para una enzima del catabolismo de la histamina. El gen TSPAB1 codifica para un mediador proteolítico de la alergia. El gen H2R codifica para un receptor con actividad inmunosupresora sobre el receptor de alta afinidad de inmunoglobulina (Ig) E.
	Células B intestinales, bazo y nódulos mesentéricos. Estudio <i>in vitro</i> .	Aumento del gen de la tromboespondina 1 (TSP1 o THBS1).	El gen TSP1 codifica para una glicoproteína que favorece la conversión del factor de crecimiento transformante beta de una proteína inactiva en activa por medio de la proteólisis.
<b>Generación de células dendríticas tolerogénicas.</b>	Células dendríticas Regulatorias. Estudio <i>in vivo</i> .	Aumento de los genes del componente 1 del complemento (CQ1), del gen del receptor de lipoproteína de baja densidad acetilada (STAB1) y del receptor IIIA para la IgG (FCGR3A).	El gen CQ1 participa en la inmunidad innata y favorece el desarrollo de células dendríticas tolerogénicas. El gen FCGR3A codifica para ese receptor de IgG que participa en la citotoxicidad dependiente de anticuerpo y en la fagocitosis.
<b>Presencia o generación de células T tolerogénicas o anérgicas o regulatorias.</b>	Células mononucleares periféricas. Estudio <i>ex vivo</i> .	Aumento de los genes IL10, TGFB1 y FOXP3. Disminución del gen IL17	La citoquina codificada por el gen IL10 disminuye la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 (MHCII) y las moléculas coestimuladoras e inhibe la capacidad presentadora de antígenos de los monocitos y de los macrófagos activados. La citoquina del gen TGFB1 induce la expresión de FOXP3 y la conversión de las células T en regulatorias y su proliferación, favorece el cambio de subclase de IgG4 en las células B y la remodelación del tejido residente, disminuye la expresión de IgE específica de antígeno e inhibe los mastocitos, los basófilos y los eosinófilos. La citoquina del gen IL17 activa las células no inmunes como las células endoteliales para que secreten quemoquinas facilitadoras de la migración de los monocitos al sitio de infección.
	Células T gamma delta.	Aumento del gen de la región variable tipo III de la cadena gamma del receptor de células T (TRVG3).	El gen TRVG3 codifica un polipéptido que forma parte de la estructura del receptor de las células T gamma delta que une un péptido antigénico con la MHCII.
	Células T anérgicas específicas de antígeno. Estudio <i>in vitro</i> .	Disminución del gen marcador de célula de memoria inactiva de largo plazo CD45RA (PTPRC, gen del receptor tipo C de la proteína tirosin fosfatasa), del gen marcador de proliferación Ki-67 (MKI67), del gen marcador de activación linfocitaria temprana (CD69), del gen de la glicoproteína de superficie CD28 específica de células T (CD28) y del gen de la enzima bifuncional adenosin difosfato ribosa ciclasa y adenosin difosfato ribosa cíclico hidrolasa 1 (CD38).	El gen CD38 codifica una glicoproteína transmembrana que es receptor de células de sistema inmune y participa en la transducción de señal a través de calcio y en la adhesión celular. El gen CD69 codifica un receptor participante en la proliferación celular y transductor de la señal en linfocitos, células NK y plaquetas. La glicoproteína de membrana codificada por el gen CD28 participa en las señales de coestimulación de las células T.
<b>Desviación de la respuesta inmune de un patrón de células T auxiliadoras tipo 2 a células T auxiliadoras tipo 1.</b>	Macrófagos y Células T	Aumento del gen de IL18 y del gen de la molécula de activación linfocítica de señalización (SLAMF1).	El gen IL8 codifica una citoquina que favorece la diferenciación de células T auxiliadoras tipo 1. El gen SLAMF1 codifica un receptor que favorece la proliferación de células activadas independiente de IL-2 durante la respuesta inmune e induce la producción de interferón gamma.
	Células T periféricas. Estudio <i>ex vivo</i> .	Disminución del gen de la citoquina IL-4 (IL4) y del gen receptor de membrana de la IL-4 (IL4R) y aumento del gen del receptor soluble de la IL-4 (sIL4R).	Esos genes participan en la vía de señalización de la citoquina IL-4 que estimula la secreción de IgE por la células B y estimula la activación y migración de eosinófilos, basófilos y mastocitos.
	Células dendríticas tipo 2 y células T. Estudio <i>in vivo</i>	Disminución del gen GATA3, del gen de la proteína quinasa serina/treonina 4 con interacción al receptor (RIPK4) y del gen de la trombomodulina o CD141 (THBD).	El factor de transcripción codificado por el gen GATA3 favorece la diferenciación de células T auxiliadoras tipo 2. El gen THBD codifica para una proteína que favorece una respuesta de citoquina T auxiliadora de tipo 2. El gen RIPK4 es codificante de una proteína que activa el factor de transcripción NF-kappa B.
<b>Influencia sobre la apoptosis de células T</b>	Células T periféricas. Estudio <i>in vitro</i> .	Disminución del gen facilitador de la apoptosis 11 parecido a BCL2 (BCL2L11), del gen alfa inducible de daño del ácido desoxirribonucleico y parada del crecimiento (GADD45A), del gen miembro 8 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFSF8) y del proto-oncogen homólogo A de reticuloendoteliosis viral (RELA).	Esos genes participan en las vías señalización de la apoptosis.
<b>Presencia de células B regulatorias</b>	Células B específicas de antígeno. Células de la lámina propia intestinal y del bazo.	Aumento del gen IL10, del gen de la proteína 6 de linfoma B (BCL6) y del gen de la región constante de la cadena pesada de la Ig gamma 4 (IGHG4).	El gen BCL6 codifica un factor de transcripción con actividad tolerogénica. El gen IGHG4 codifica anticuerpos de la subclase IgG4 con actividad antiinflamatoria.

Nota: \*Comité de nomenclatura de genes del proyecto de genoma humano (HUGO Gene Nomenclature Committee) tomado de [https://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?hgnc\\_id=HGNC:9955](https://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=HGNC:9955). \*\* Función enriquecida con la información del sitio: <http://www.genecards.org/> que pertenece a la base de datos de Genes Humanos.

**Tabla 1.** Los genes de los diferentes mecanismos propuestos para la acción de la inmunoterapia de antígeno específico en las enfermedades alérgicas.



**Figura 1.** Diagrama de circuitos que muestra el efecto de la inmunoterapia de antígeno específico (ITAE) sobre la expresión de los genes en los diferentes compartimentos celulares (rectángulos) según el tiempo de aparición: A corresponde a los cambios muy rápidos; B, a los cambios tempranos; C, a los cambios intermedios y D, a los cambios tardíos. Se observa el eje central que forman las células dendríticas regulatorias, T regulatorias y B regulatorias y sus genes en inhibir la actividad de las células T auxiliares tipo 2 y tipo 17, las células B efectoras y las células plasmáticas generadoras de inmunoglobulina E específica y por otro lado, estimular las células T auxiliares tipo 1 y favorecer la diferenciación de células plasmáticas secretoras de IgG4 específica con actividad antiinflamatoria. Las flechas hacia arriba al lado de la nomenclatura de los genes significa aumento de la expresión; las flechas hacia abajo, disminución de la expresión de los genes. Las líneas con saetas son señales estimulatorias y las líneas sin saetas son señales inhibitorias.

ITAE y butirato de sodio se convierten en células B regulatorias secretoras de la citoquina IL-10 con aumento de la expresión de los genes BCL6 e IL10 y disminución de la expresión de IGHE. Mientras esas células fueron tratadas con el antígeno generaron células plasmáticas (CD138+) con disminución de BCL6 e IL10 y aumento de la expresión de IGHE. Esa acción del butirato de sodio fue dependiente de la vía de señalización del receptor de células B porque se pierde cuando se emplea un bloqueador de esa vía de señalización. La ITAE combinada con el agente probiótico disminuyó más la inflamación intestinal de los ratones que la ITAE sin ese agente.

**Consideraciones sobre esos estudios de expresión de genes en la inmunoterapia de antígeno específico y su aplicación en las enfermedades autoinmune.**

El desarrollo de la ITAE para enfermedades alérgicas y

autoinmune requiere un enfoque multidisciplinario y es un camino largo de investigación donde se definan algunas partes claves como son: la configuración exacta de los epítopos o antígenos; los métodos de obtención y purificación de esos componentes; las dosis, las vías y frecuencia de su administración; el uso de adyuvantes adecuados; la identificación de parámetros inmunológicos efectivos para el monitoreo evolutivo de cada enfermedad y su posible correlación con la desensibilización o inducción de tolerancia; la combinación adecuada de esta inmunoterapia con otras como la antiinflamatoria no específica; un diagnóstico más temprano de la enfermedad para un inicio más precoz del tratamiento y una mayor efectividad; definir la población de pacientes respondedores y un diseño adecuado de los estudios preclínicos y clínicos que determinen su implementación final en el registro de salud pública. 33 En ese proceso de desarrollo de la ITAE para las enfermedades

alérgicas se ha empleado la farmacogenómica en varias de sus partes importantes.

La selección de pacientes respondedores a la ITAE a través de la farmacogenómica no ha tenido un impacto en las alergias y sí parece tenerlo en las enfermedades autoinmunes. La utilización de las pruebas genéticas en la ITAE de estas enfermedades va a depender del grado de penetrancia de los genes en sus inmunopatogénesis, la frecuencia de estos genes predisponentes en la población afectada y por otro lado, en la no existencia de otras alternativas de tratamiento lo suficientemente eficaces. En el desarrollo de la ITAE de Nervax2 para la enfermedad celíaca no sólo se mide la presencia de los alelos HLA DQ2 sino también como los péptidos de la vacuna modifican la actividad de los linfocitos T de sangre periférica de estos pacientes. Estas pruebas garantizan con un alto valor predictivo el beneficio de esta inmunoterapia cuando el tratamiento de restricción dietética existente no es efectivo en todos los casos y es difícil lograr la adherencia de los pacientes a llevarlo a cabo. Algo parecido ocurre con las enfermedades alérgicas donde la ITAE subcutánea está indicada sólo en los pacientes con sintomatología de moderada a grave controlada y tienen altos títulos de IgE específica o una prueba reactiva cutánea específica al alérgeno. Se administra la ITAE para aumentar el beneficio sobre el riesgo que puede existir al someterlo a la exposición antigénica y la posibilidad de desencadenar una reacción de anafilaxia. Sin embargo, con la ITAE sublingual- donde no se ha reportado ningún evento adverso grave- algunos autores abogan para que sea utilizado como tratamiento de primera línea. Sobre todo, porque después de la primera consulta el paciente puede hacer el tratamiento en su casa.

En la búsqueda de diagnosticadores de eficacia clínica a la ITAE se empleó las ventajas de las técnicas farmacogenómicas conjuntamente con otras tecnologías como son: el Elispot, la citometría de flujo, el inmunoensayo enzimático y la proteómica. Con la farmacogenómica se reconoció una propiedad emergente como la existencia de un ambiente protolerogénico e inmunoadyuvante en la región vestibular mayor que en la sublingual de la mucosa oral y esta a su vez mayor que en la piel después del estudio de varios grupos de genes con diferencias funcionales y de localización celular. También, se descubrió nuevos genes expresados diferencialmente entre varias condiciones experimentales *in vitro* en células dendríticas derivadas de monocitos, y luego se realizó el análisis de muestras de sangre *in vivo* de esos genes mediante la RCPc. Donde se aprovechó su alta sensibilidad para consumir pequeños volúmenes de sangre, poca cantidad de células y sin realizar expansión celular *in vitro*<sup>34</sup>. De este modo, la RCPc estudia la respuesta inmune periférica con una disminución del consumo de tiempo al no aislarse las células mononucleares de la sangre y se evita activar las células inmunes o modular los niveles de ARN mensajero de citoquinas no relacionada con el objetivo de estudio (algo que sucede con las células purificadas).

Esos cambios en genes asociados con la DCREG y DC2 pueden ser usados para detectar temprano el inicio de la respuesta clínica por la ITAE y constituye un perfil temprano dentro del sistema inmune innato de la orientación ulterior de la respuesta inmune adaptativa como es la transición de una respuesta de células T auxiliaadoras tipo 2 y tipo 17 a las células T auxiliaadoras regulatorias y de tipo 1. Esos posibles diagnosticadores deben ser confirmados en la práctica clínica mediante su validación en estudios prospectivos con una mayor cantidad de pacientes que reaccionan a diferentes alérgenos (polen de hierba y árboles, y ácaro del polvo doméstico) y su correlación con la respuesta terapéutica favorable. En el estudio de los ge-

nes de las citoquinas y de las quemoquinas de los linfocitos T a nivel sistémico con la RCPc se pudo observar asociación con la respuesta clínica al tratamiento, pero no se encontró asociación con el beneficio clínico como sí sucedió con los genes de las células dendríticas.

Esas alteraciones del perfil de expresión de genes de células T o B, basófilos y células dendríticas pueden ser diagnosticadores subrogados de la inmunoterapia y tienen la desventaja de su evaluación tras un procesamiento y ejecución compleja, lo cual puede hacer difícil su uso clínico rutinario. Sin embargo, pueden formar parte en las pruebas de concepto de vacunas para estas enfermedades a nivel de ensayos preclínicos y clínicos y participar en la decisión de que candidatos preventivos o terapéuticos de ITAE puedan pasar a la siguiente fase de desarrollo. También algunos investigadores han desarrollado protocolos de laboratorio que favorecen la utilización de estas tecnologías a partir de varias fuentes de sangre o tejido con estimulación antigénica (respuesta *ex vivo*) o sin ella en los estudios clínicos multicéntricos<sup>35, 36, 37</sup>.

Estas tecnologías farmacogenómicas se han empleado en la profundización de los mecanismos de la inmunoterapia para aumentar su eficacia y acortar el tiempo para lograr un beneficio precoz en la salud de los pacientes. La alta sensibilidad de estas tecnologías logra determinar las bajas concentraciones relativas de los genes de citoquinas y quemoquinas en los sitios locales de inflamación, lo cual puede ser más indicativo de los efectos inmunológicos de la ITAE que a nivel sistémico<sup>38</sup>. Cuando la frecuencia de las células inmune específicas sanguíneas es baja, la detección de las citoquinas y las quemoquinas de esas células es más difícil porque se diluyen en la mezcla de las moléculas secretadas por las células T o B con otras especificidades. El éxito de la ITAE depende de discriminar las células T reguladoras o efectoras autoantigénicas o alérgicas específicas periféricas o de memoria de las células T observadoras o expectantes. Por lo que, tener una información complementaria del balance fino del número de tipos y subtipos de células efectoras y regulatorias de la inmunidad innata y adquirida mediante citometría de flujo o Elispot es importante. También, se sugiere realizar una cinética en la determinación de las respuestas porque la supresión de algunos subtipos de células puede ser transitoria como ocurre con las células T auxiliaadoras tipo 2 efectoras que se relocalizan en los órganos linfáticos centrales o porque ocurre infecciones virales en el paciente que pueden alterar el cuadro de la tolerancia inmune durante la ITAE<sup>39</sup>. Se debe identificar aquellos genes expresados que no sean correlacionados o correlugados entre sí (como la existente entre los genes LAG3, TIGIT y HAVCR2 con el gen IL10) para definir los factores genéticos esenciales y no redundantes que influyen en el éxito de la ITAE en modular mejor la respuesta inmune (figura 1).

Para estudiar la influencia de la ITAE sublingual de ácaro de polvo sobre el sistema neuroendocrino de los niños alérgicos se determinó las concentraciones de prolactina y la hormona adenocorticotropina o ACTH<sup>40</sup>. Las concentraciones de prolactina, de proteína catiónica de eosinófilos y de la citoquina IL-13 fueron disminuidas. Las concentraciones de ACTH no variaron. Se interpretó que la prolactina secretada por los linfocitos representa una disminución de la actividad de células T auxiliaadoras tipo 2 y tiene poco efecto su función endocrina en la ITAE. El efecto de esa inmunoterapia sobre el sistema neuroendocrino se ha estudiado mediante la farmacogenómica cuando las hormonas y los neuropéptidos liberados por ese sistema modifican la expresión de los genes de sus receptores y sus factores de transcripción asociados en los linfocitos o como estos últimos modifican la expresión de los genes de

esas moléculas al ponerse en contacto con los antígenos de la inmunoterapia y estimulan el sistema nervioso. En las enfermedades alérgicas existe un gran efecto placebo cuando los pacientes son tratados con algún medicamento, por lo que la Organización Mundial de Alergia recomienda reportar la eficacia mínima relevante de la ITAE sublingual en el grupo tratado de un 20 – 30 % mayor que el grupo no tratado<sup>41</sup>. En las enfermedades autoinmune se espera ese efecto, así como la influencia hormonal que puede existir por ser más frecuente en el sexo femenino y los cambios que ocurren en su evolución durante el embarazo y el climaterio.

Los mecanismos genéticos antes mencionados de la ITAE en las enfermedades alérgicas deben ser tenido también en cuenta en las enfermedades autoinmune porque en ambos casos se añaden al efecto patogénico inmunoregulatorio y ambiental. Los estudios farmacogenómicos aplicados a esta inmunoterapia en seres humanos con enfermedades alérgicas es mucho mayor que en las enfermedades autoinmune y han servido para ganar en la comprensión de los procesos de inducción de tolerancia de una manera mejorada y refinada, minimizar los riesgos asociados con el tratamiento y buscar estrategias de intervención inmune dirigida a moléculas dianas relacionadas con el mecanismo molecular de células T y B efectoras y regulatorias (figura 1). Estos mecanismos de desensibilización o inducción de tolerancia también pueden evitar o disminuir la respuesta inmune indeseada de agentes polipeptídicos en el tratamiento de otras enfermedades<sup>42</sup>.

## Conclusiones

La farmacogenómica se ha empleado en el estudio de varias partes críticas del desarrollo de ITAE de autoantígenos y alérgenos. Se busca detectar lo más temprano posible con la farmacogenómica y otras tecnologías afines el aumento en el umbral de activación de las células efectoras y cambios en las células T y B que denoten disminución de sus poblaciones de memoria antígeno específico efectora y aumento de sus poblaciones antígeno específico regulatoria o anérgica de larga duración producto de la ITAE. Los cambios más temprano del efecto de las ITAE ocurre a nivel de las células inflamatorias efectoras y de las células dendríticas.

El estudio de los mecanismos de acción de la ITAE mediante la farmacogenómica facilita mejorar el proceso de inducción de tolerancia o desensibilización con esquemas más cortos y vías de administración más eficientes y segura en combinación o no con otros medicamentos, lo cual favorece la adherencia del paciente al tratamiento. Las enfermedades con una gran influencia del factor genético en la evolución y en el tratamiento favorece que las tecnologías farmacogenómicas sean empleadas para seleccionar a los pacientes que responderán a la ITAE.

La tendencia de las tecnologías farmacogenómicas en el desarrollo de la ITAE consiste en su utilización conjunta con otras pruebas para estudiar el sistema inmune, favorecer el desarrollo de diagnosticadores predictivos y subrogados y a los estudios de los mecanismo de acción de esta inmunoterapia, identificar nuevas dianas moleculares para desarrollar medicamentos y propiciar la generación de modelos animales con estas enfermedades lo más similar a las humanas que permitan un mejor examen de las células inmunotolerantes.

## Referencias bibliográficas

1. Chae-Seo Rhee. Current Specific Immunotherapy for Allergic Rhinitis: Perspectives from Otorhinolaryngologists. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2014 July; 6(4):273-275.
2. Venero-Fernandez SJ. Estadísticas de Asma. Cuba, 2016. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. Disponible en <http://files.sld.cu/alergia/files/2017/05/Estad%C3%ADsticas-de-Asma-2016.pdf> [consultado 14 de marzo de 2018].
3. Cooper GS, Bynum MLK, Somers EC. Recent Insights in the Epidemiology of Autoimmune Diseases: Improved Prevalence Estimates and Understanding of Clustering of Diseases. *J Autoimmun.* 2009; 33(3-4): 197–207.
4. Marth K, Focke-Tejkl M, Lupinek C, Valenta R, Niederberger V. Allergen Peptides, Recombinant Allergens and Hypoallergens for Allergen-Specific Immunotherapy. *Current Treatment Options in Allergy* 2014; 1:91-106. doi 10.1007/s40521-013-0006-5. Specific Immunotherap
5. Álvarez M, Castro RL, Gutiérrez DR, Labrada A, Enríquez I, Ronquillo M et al. Prescripción y vigilancia de la inmunoterapia sublingual con vacunas estandarizadas de ácaros domésticos en un servicio de alergología. *VacciMonitor* 2012; 21(3):13-18.
6. Cezmi A, Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ J.* 2015; 8(1): 1–12. doi: 10.1186/s40413-015-0063-2.
7. Goel G, King T, Daveson AJ, Andrews JM, Krishnarajah J, Krause R, et al. Epitope-specific immunotherapy targeting CD4-positive T cells in coeliac disease: two randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1 studies. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017 Jul;2(7):479-93. doi: 10.1016/S2468-1253(17)30110-3.
8. Zimmer A, Bouley J, Le Mignon M, Pliquet E, Horiot S, Turfkruyer M et al. A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129 (4): 1020-30.
9. Gueguen C, Bouley J, Moussu H, Luce S, Duchateau M, Chamot-Rooke J et al. Changes in markers associated with dendritic cells driving the differentiation of either TH2 cells or regulatory T cells correlate with clinical benefit during allergen immunotherapy (abstract). *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Feb;137(2):545-58. doi: 10.1016/j.jaci.2015.09.015.
10. Bonvalet M, Moussu H, Wambre E, Ricarte C, Horiot S, Rimaniol AC et al. Allergen-specific CD4+ T cell responses in peripheral blood do not predict the early onset of clinical efficacy during grass pollen sublingual immunotherapy. *Clin Exp Allergy.* 2012;42(12):1745-55. doi: 10.1111/cea.12015.
11. Li CW, Lu HG, Chen DH, Lin ZB, Wang DY, Li TY. In vivo and in vitro studies of Th17 response to specific immunotherapy in house dust mite-induced allergic rhinitis patients. *PLoS One.* 2014; 19;9(3):e91950. doi: 10.1371/journal.pone.0091950.
12. Nieminen K, Valovirta E, Savolainen J. Clinical outcome and IL-17, IL-23, IL-27 and FOXP3 expression in peripheral blood mononuclear cells of pollen-allergic children during sublingual immunotherapy (abstract). *Pediatr Allergy Immunol.* 2010; 21(1 Pt 2): e174-84. doi: 10.1111/j.1399-3038.2009.00920.x.
13. Ryan JF, Hovde R, Glanville J, Lyua SCh, Jia X, Gupta S, et al. Successful immunotherapy induces previously unidentified allergen-specific CD4+ T-cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(9):E1286-95. doi: 10.1073/pnas.1520180113.
14. ImmusanT, Inc. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Evaluate the Safety and Tolerability of Nexvax2 Preceded by a Dose Titration Period in Subjects With Celiac Disease Currently on a Gluten-Free Diet. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02528799> [consultado 20 abril 2017].
15. Cintado A, Sorell L, Galván JA, Martínez L, Castañeda C, Fragoso T et al. HLA DQA1\*0501 and DQB1\*02 in Cuban celiac patients. *Hum Immunol.* 2006;67(8):639-42.



16. Ontiveros N, Tye-Din JA, Hardy MY, Anderson RP. Ex-vivo whole blood secretion of interferon (IFN)- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ -inducible protein-10 measured by enzyme-linked immunosorbent assay are as sensitive as IFN- $\gamma$  enzyme-linked immunospot for the detection of gluten-reactive T cells in human leucocyte antigen (HLA)-DQ2,5(+)-associated coeliac disease. *Clin Exp Immunol*. 2014;175(2):305-15. doi: 10.1111/cei.12232.
17. Streeter HB, Rigden R, Martin KF, Scolding NJ, Wraith DC. Pre-clinical development and first-in-human study of ATX-MS-1467 for immunotherapy of MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2015;2(3):e93. doi: 10.1212/NXI.0000000000000093.
18. Fernández-de-Cossío ME, Cintado A, Nazabal M, Hanlet C, Díaz T, Villarreal A, et al. HLA-DRB1\*1101 allele confer protection for Multiple Sclerosis disease in Cuban population. *Bionatura*. 2016; 1(4): 184-89. doi: 10.21931/RB/2016.01.04.5.
19. Yang G, Geng XR, Liu ZQ, Liu JQ, Liu XY, Xu LZ et al. TSP1-producing B cells restore Ag specific immune tolerance in an allergic environment. *J Biol Chem*. 2015; 290(20): 12858-67. doi: 10.1074/jbc.M114.623421.
20. Burton BR, Britton GJ, Fang H, Verhagen J, Smithers B, Sabatos-Peyton CA et al. Sequential transcriptional changes dictate safe and effective antigen-specific immunotherapy. *Nat Commun*. 2014; 5:4741. doi: 10.1038/ncomms5741.
21. MacLeod MK, Anderton SM. Antigen-based immunotherapy (AIT) for autoimmune and allergic disease. *Current Opinion in Pharmacology* 2015, 23:11-16.
22. Anderson RP, Jabri B. Vaccine against autoimmune disease: antigen-specific immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(3):410-7. doi: 10.1016/j.coi.2013.02.004.
23. Pabst O and Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunology* 2012; 5 (3): 232-39.
24. Allam J-P, Duan Y, Winter J, Stojanovski G, Fronhoffs F, Wenghoefer M, et al. Tolerogenic T cells, Th1/Th17 cytokines and TLR2/TLR4 expressing dendritic cells predominate the microenvironment within distinct oral mucosal sites. *Allergy* 2011; 66: 532-39.
25. Lopes A, Azenha P, Teodósio C, Inácio M, Silva I, Loureiro G, et al. Impact of allergic rhinitis and specific subcutaneous immunotherapy on peripheral blood basophils of patients sensitized to Dermatophagoides pteronyssinus. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2013; 9(1): 40. doi: 10.1186/1710-1492-9-40.
26. Novak N, Mete N, Bussmann C, Maintz L, Bieber T, Akdis M, et al. Early suppression of basophil activation during allergen-specific immunotherapy by histamine receptor J *Allergy Clin Immunol*. 2012;130(5):1153-58.e2. doi: 10.1016/j.jaci.2012.04.039.
27. Savolainen J, Nieminen K, Laaksonen K, Laiho T, Jacobsen L, Lahesmaa R, et al. Allergen-induced in vitro expression of IL-18, SLAM and GATA-3 mRNA in PBMC during sublingual immunotherapy. *Allergy*. 2007;62(8):949-53.
28. Zheng R, Wu X, Huang X, Chen Y, Yang Q, Li Y, et al. Gene expression pattern of Treg and TCR V $\beta$  subfamily T cells before and after specific immunotherapy in allergic rhinitis. *J Transl Med*. 2014; 12: 24. doi: 10.1186/1479-5876-12-24.
29. Nestor CE, Dadfar E, Ernerudh J, Gustafsson M, Björkander J, Benson M et al. Sublingual immunotherapy alters expression of IL-4 and its soluble and membrane-bound receptors. 2014; 69 (11):1564-66. doi: 10.1111/all.12505.
30. Jones SM, Pons L, Roberts JL, Scurlock AM, Perry TT, Kulis M, et al. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 124(2): 292-300. doi: 10.1016/j.jaci.2009.05.022.
31. van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Söllner S, Akdis DG et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(4): 1204-12. doi: 10.1016/j.jaci.2013.01.014.
32. Shi Y, Xu LZ, Peng K, Wu W, Wu R, Liu ZQ et al. Specific immunotherapy in combination with *Clostridium butyricum* inhibits allergic inflammation in the mouse intestine. *Sci Rep*. 2015 ;5:17651. doi: 10.1038/srep17651.
33. Maria F, Winner HL. Oral tolerance: Therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol* 2006; 13(2-4): 143-157.
34. Stordeur P. Monitoring the immune response using real-time PCR. *Methods Mol Biol*. 2009;496: 323-38. doi: 10.1007/978-1-59745-553-4\_22.
35. Chakera A, Bennett SC, Cornall RJ. A whole blood monokine-based reporter assay provides a sensitive and robust measurement of the antigen-specific T cell response. *J Transl Med* 2011, 9:143. doi:10.1186/1479-5876-9-143.
36. Schultz-Thater E, Frey DM, Margelli D, Raafat N, Feder-Mengus C, Spagnoli GC et al. Whole blood assessment of antigen specific cellular immune response by real time quantitative PCR: a versatile monitoring and discovery tool. *J Transl Med* 2008, 6:58 doi:10.1186/1479-5876-6-58.
37. Lowe KB, Taylor JL, Storkus WJ. Monitoring Antigen-Specific T Cell Responses Using Real-Time PCR. *Methods Mol Biol*. 2014; 1186: 65-74. doi:10.1007/978-1-4939-1158-5\_5.
38. Shamji MH, Kappen JH, Akdis M, Jensen-Jarolim E, Knol EF, Kleine-Tebbe J et al. Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI Position Paper. *Allergy*. 2017;72(8): 1156-73. doi: 0.1111/all.13138.
39. Küçüksezer UC, Palomares O, Rückert B, Jartti T, Puhakka T, Nandy A et al. Triggering of specific Toll-like receptors and proinflammatory cytokines breaks allergen-specific T-cell tolerance in human tonsils and peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(3):875-85. doi: 10.1016/j.jaci.2012.10.051.
40. Ippoliti F, De Santis W, Volterrani A, Lenti L, Canitano N, Lucarelli S et al. Immunomodulation during sublingual therapy in allergic children. *Pediatr Allergy Immunol* 2003;14:216-221.
41. Canonica GW, Cox L, Pawankar R, Baena-Cagnani CE, Blaiss M, Bonini S, et al. Sublingual immunotherapy: World Allergy Organization position paper 2013 update. *World Allergy Organ J*. 2014; 7(1): 6. doi: 10.1186/1939-4551-7-6.
42. van Brummelen EMJ, Willeke R, Wolbink G, Beijnen JH, Schellens JHM. Antidrug Antibody Formation in Oncology: Clinical Relevance and Challenges. *Oncologist*. 2016; 21(10): 1260-1268. doi: 10.1634/theoncologist.2016-0061.

**Recibido: 6 junio 2018**

**Aprobado: 4 agosto 2018**

## REVIEW / ARTÍCULO DE REVISIÓN

# Recombinant Human Erythropoietin. The problem of glycosylation. Eritropoyetina Humana Recombinante. El problema de la glicosilación.

Nicolás Varas, Frank Camacho, Oliberto Sánchez.

DOI. [10.21931/RB/2018.03.03.10](https://doi.org/10.21931/RB/2018.03.03.10)

**Abstract:** The human erythropoietin (hEPO) is the main hormone concerned with stimulation of erythropoiesis and maintain of erythroid stem cells physiologic levels. Its deficiency causes severe anemia and happens to patients with kidney failure because of traumas, graft, chemotherapy, diabetes, etc. Hormone supply is an essential treatment on these patients. Currently, the recombinant human erythropoietin (rhEPO) is mainly produced in genetically modified CHO cells, regardless of the high cost, because those produced in other cell lines or organisms have different patterns of glycosylation and subsequently a reduced *in vivo* activity. One alternative could be use a rhEPO without glycosylations, however, this variant has almost null *in vivo* activity, despite of having a higher *in vitro* activity and affinity for its receptor (EPOR) than native hEPO. The glycosylations generates limitations for the production of rhEPO, but they give important advantages to the protein like an augmented molecular weight and a decreased affinity for EPOR. In this review we summarized the principal biotechnological problems of the rhEPO glycosylations and we give insights of some possible solutions that have been tried to overcome those issues.

**Key words:** Erythropoietin, Glycosylations, Recombinant protein production, Erythropoietin Receptor, *in vivo* activity.

**Resumen:** La eritropoyetina humana (hEPO) es la principal hormona encargada de estimular la eritropoyesis y mantener los niveles de las células madres hematopoyéticas. Su deficiencia causa anemia severa y ocurre en pacientes con fallo renal debido a traumas, trasplantes, quimioterapia, diabetes u otros. Para el tratamiento de estos pacientes es necesario el suministro externo de la hormona. En la actualidad la eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) es producida en cultivo de células CHO, a pesar del alto costo, debido a que la producida en otras células u organismos presenta patrones de glicosilación diferentes y por tanto una actividad *in vivo* disminuida. Una alternativa podría ser utilizar rhEPO sin glicosilaciones, sin embargo, esta variante posee una actividad *in vivo* casi nula, a pesar de poseer una mayor actividad *in vitro* y mayor afinidad por su receptor (EPOR) que la hEPO nativa. Las glicosilaciones generan limitaciones en la producción de la rhEPO pero le otorgan importantes ventajas a la proteína como un aumento de peso molecular y una disminución de la afinidad por EPOR. En esta revisión bibliográfica repasamos los principales problemas biotecnológicos que conllevan las glicosilaciones de la rhEPO y revisamos algunas posibles soluciones que se han intentado para superar estos problemas.

**Palabras clave:** eritropoyetina, glicosilaciones, producción de proteína recombinante, receptor de eritropoyetina, actividad *in vivo*.

## Introduction

Human Erythropoietin (hEPO) is the main hormone involved in the differentiation, proliferation and maintaining of physiologic levels of erythroid stem cells<sup>1</sup>, it was also the first hematopoietic growth factor known<sup>2</sup>. The hEPO is an acid glycoprotein, produced by the liver during the fetal stage and mostly the kidney in adult, it is mainly secreted as a response of acute anemia (Figure 1). Its regulation depends on blood oxygen levels and its expression is controlled by the hypoxia inducible factor HIF1<sup>3</sup>.

The hEPO is a 165 amino acids glycoprotein and an estimated molecular weight of 30,4 kDa. It has two internal disulfide bonds between the cysteines 7-161 and 29-33, which are essential for maintaining the biological activity<sup>4,5</sup>. The glycosylations are 40% of the protein molecular weight and they are located in three potential N-linked glycosylation sites on Asn24, Asn38 and Asn83, plus a potential O-glycosylation site on Ser126<sup>6-9</sup>.

These glycosylations plays an important role for hEPO *in vivo* activity and it has been described that the most active fraction is the one with tetra-antennary tetra-sialylated terminations<sup>10,11</sup>. The glycosylations reduces rhEPO glomerular filtration rate thanks to the increase in molecular weight and they also reduces its hepatic clearance because of the sialic

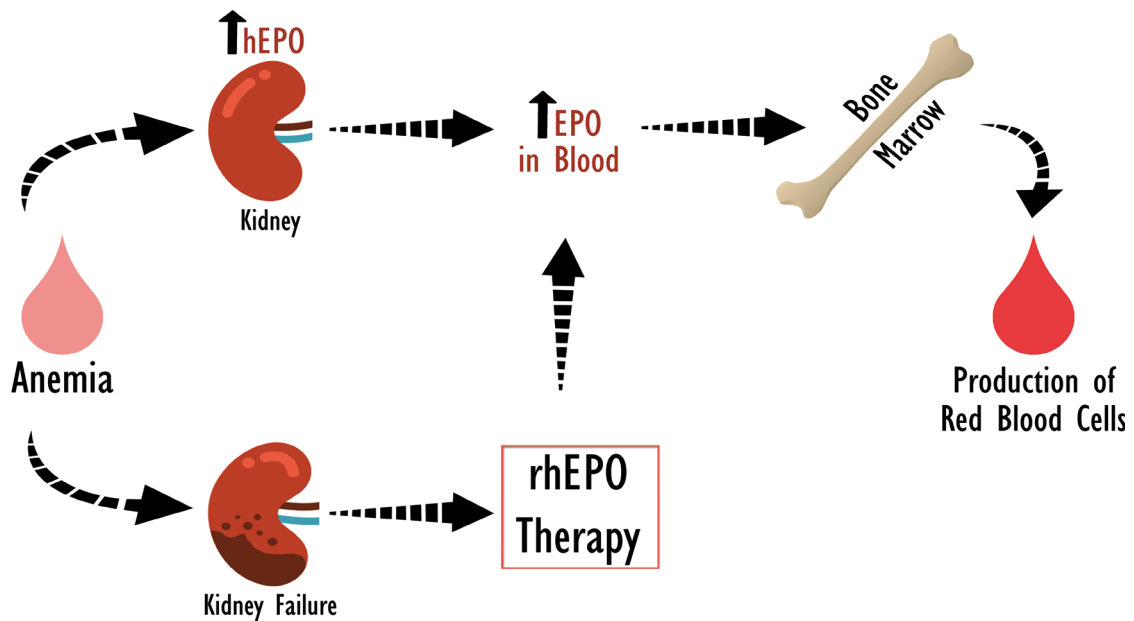
acid terminations which protects it from galactose and mannose receptors in the liver<sup>7,12,13</sup>.

The deficiency of hEPO in the organism causes severe anemia. This condition is observed in patients with chronic kidney failure associated primarily to trauma, transplants and diabetes<sup>14</sup>. Deficiency of hEPO is also associated to the effects of cancer chemotherapies, zidovudine treatments in patients with HIV and ribavirin treatment in patients with Hepatitis C. The administration of the recombinant hormone is essential to solve or minimize the effects of the anemia on this diseases<sup>15,16</sup>, as it shows the Figure 1.

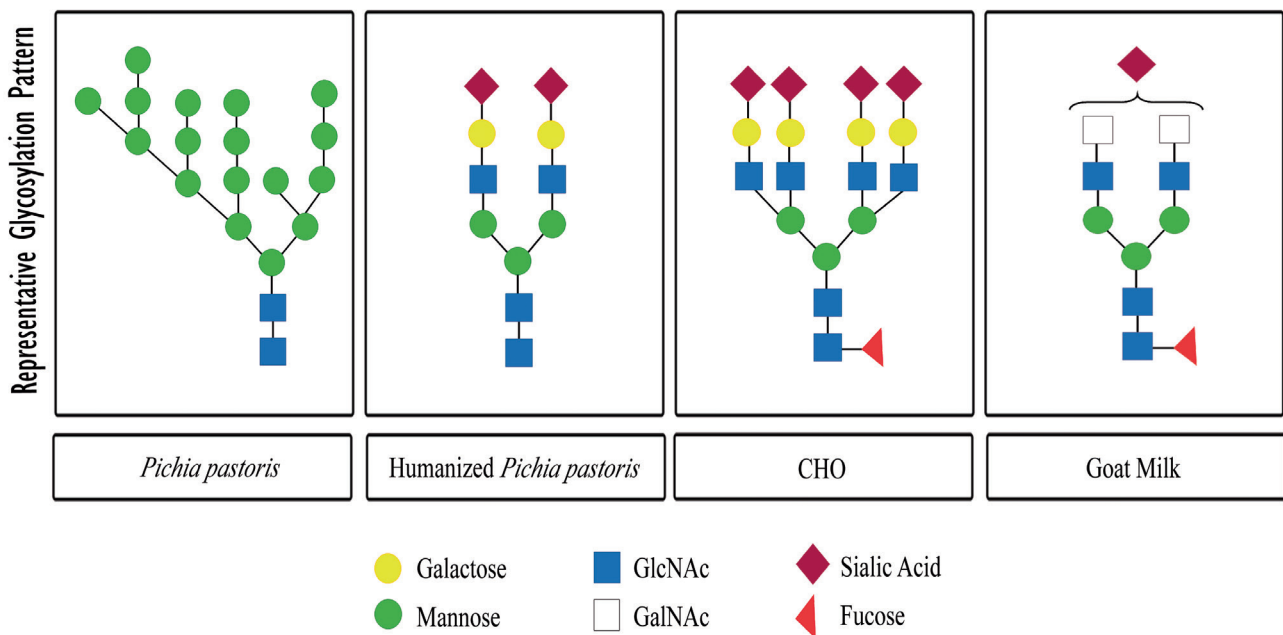
## Recombinant hEPO production

Almost all recombinants human Erythropoietin (rhEPO) used today as a biopharmaceutical are produced in genetically modified CHO cells. This cell line comes from the ovary of Chinese hamster and is widely used for the expression of recombinant proteins with therapeutic purposes. The current production of rhEPO and its variants, for both clinical and research purposes, is mainly done in mammalian cell lines due to the structural complexity of rhEPO and the importance of posttranslational modifications on its activity<sup>5,7</sup>. Some groups have produced rhEPO in bacteria like *Escherichia coli* and *Baci-*

<sup>1</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile.



**Figure 1.** Function of hEPO and importance of rhEPO. Under normal conditions the kidney secretes hEPO in response to anemia. This causes a stimulation of differentiation and proliferation of erythroid stem cells in bone marrow, thus correcting the anemia. When the kidney is damaged it is needed an external supply of the recombinant hormone to prevent chronic anemia.



**Figure 2.** Representative glycosylation pattern for rhEPO. Çalic *et al.* (2007)<sup>20</sup> described the high mannose pattern of rhEPO produced in *P. pastoris*. Gong *et al.* (2013)<sup>23</sup> described the glycosylation pattern of humanized *P. pastoris* as bi-antennary bi-sialylated. Sasaki *et al.* (1987)<sup>27</sup> defined the glycosylation pattern of rhEPO produced in CHO cells, the most abundant and active fraction is tetra-antennary and tetra-sialylated. Montesino *et al.* (2008)<sup>47</sup> studied the glycosylation pattern of rhEPO produced in goat milk, the most abundant and finished fraction is bi-antennary and mono-sialylated.

*llus brevis*, but it lacks *in vivo* activity due to the absence of glycosylations<sup>17,18</sup>. Since yeast or filamentous fungi are commonly used for the production of complex proteins, they could be a solution for rhEPO, however they generate a different pattern of glycosylation which affects glycosylation sensitive proteins like rhEPO<sup>19,20</sup>. That is why enterprises like GlycoFi Inc, a Merck & Co. subsidiary, have emerged. They produce biopharmaceuticals in yeast strains that are engineered to perform specific human glycosylation. For example, they have produced sialylated rhEPO in "humanized" *Pichia pastoris* and showed that it

was functional with a pharmacokinetics and a pharmacodynamics similar to the rhEPO produced in CHO cells<sup>21,22</sup>, despite having mostly bi-antennary glycosylations<sup>23</sup>.

Nowadays, all products of rhEPO commercialized in USA or Europe are produced in CHO cell line<sup>24</sup>. Although, some groups have tried different cell lines, such as rhEPO produced in myeloma, kidney of baby hamster, kidney of human embryo and human retina derived cells<sup>25</sup>. These cell lines generate different patterns of glycosylation, but CHO and BHK cells were found to sialylate rhEPO more effectively<sup>26</sup>. It is known that

each of the three potential N-linked glycosylation sites can be occupied with a range of possible different glycans, and this is also valid for the potential O-linked glycosylation site<sup>27-32</sup>. This glycan heterogeneity is presented among different cell lines, different products synthesized in the same cell line and even among batches of the same product<sup>27, 30, 33-38</sup>. From a biotechnological point of view, this is a particularly relevant problem because it causes, for rhEPO, a dependence between the *in vivo* activity and production method due to variation of post-translational modifications<sup>7, 35, 37, 39</sup>.

Recombinant proteins production in mammalian cell have drawbacks such as the high cost and the fact that is a technically demanding process<sup>40</sup>. An alternative method used to overcome these problems is the production of recombinant proteins in the milk of transgenic animals<sup>41-43</sup>. Using this technology it is possible to detect the protein in the milk of transgenic animals, but the expression levels are low and it is reported that ectopic expression of the gene can affect the health of the animal<sup>43</sup>. Another alternative has been the *in situ* transduction of the mammary gland with viral vectors. Using adenoviral vectors Sánchez O. *et al* (2004)<sup>43</sup> achieved high levels of human growth hormone (hGH) in the milk of mice and goats. Later, they produced as high as 2 g/L of rhEPO in goat's milk<sup>44</sup>. These results show the capability of producing high levels of recombinant proteins in the milk of non-transgenic animals. However, the rhEPO produced in goat milk showed a low *in vivo* hematopoietic activity caused by a different pattern of glycosylation, specifically it presented a low level of sialylation<sup>46, 47</sup>. Figure 2 summarizes representative glycosylation patterns for rhEPO of some production methods mentioned above, it is important to note that all cells and organisms generate a broad spectrum of intermediate glycosylations.

### Aglycosylated rhEPO

As previously described, the glycosylated rhEPO produced in CHO cells exhibit a hematopoietic *in vivo* activity similar to native hEPO. Though, the hormone expressed in other cells or organisms tend to suffer important variations on its activity due to different patterns of glycosylation. One possible solution could be using a rhEPO without glycosylations, however it has been observed that the aglycosylated form of rhEPO has an almost null *in vivo* activity, despite of having greater *in vitro* activity compared to the native protein<sup>7, 12, 39, 48-54</sup>. As a consequence of the absence of glycosylations, the aglycosylated rhEPO is cleared from plasma 20 times faster than the highly sialylated protein<sup>55</sup>. Interestingly, the aglycosylated rhEPO exhibit an affinity and a velocity of union to its receptor at least five times higher than the glycosylated counterpart and this increases markedly the *in vitro* activity of the aglycosylated form<sup>50, 51, 53, 56</sup>. Notably, this increase is negatively correlated with the sialic acid content of the molecule<sup>10, 51, 57</sup>. Unfortunately, the lack of *in vivo* activity prevents aglycosylated rhEPO from being a viable choice as a biopharmaceutical and it does not allow to explore cheaper and more efficient productive alternatives

### Regulation through hEPO receptor

One of the most important mechanisms of signaling regulation of hEPO is the internalization of the complex between hEPO and its receptor (EPOR) and later degradation of the hormone at target cells<sup>58-60</sup>. The internalization of hEPO-EPOR complex also controls the cell sensitivity to the hormone and it is crucial to negatively regulate hEPO levels on blood circulation<sup>61, 62</sup>. In fact, evidence shows that the clearance of hEPO is

directly correlated with EPOR levels at bone marrow<sup>63-67</sup>. One interesting fact is that the persistence of union between hEPO and its receptor is altered by the high content of sialic acid. The reason for this is that negatively charged glycosylations alter electrostatics interactions and causes a diminished affinity inversely related to the number of glycosylations<sup>68, 69</sup>. The base of this is the interaction at complex interface which occurs between positively charged amino acids at rhEPO and negatively charged amino acids at EPOR<sup>70</sup>. The decreased affinity of hEPO for EPOR, given by glycosylations, causes an increase on its half-life thanks to a lower internalization of the complex<sup>62</sup>.

All this knowledge has been utilized to create the biopharmaceutical Darbepoetin alfa (Aranesp<sup>®</sup>), which is based on a hyperglycosylated rhEPO. The excess of glycosylations gives it a four times lower affinity for EPOR plus a higher molecular weight which results in a three times greater half-life than native hEPO<sup>69, 71</sup>. Studies with Darbepoetin alfa has shown that excess of glycosylations, independent of position, increases the persistence of rhEPO in blood circulation. This generates an augmented and prolonged *in vivo* activity which overcome the affinity reduction to its receptor<sup>72</sup>.

It could look paradoxical that a decrease in affinity for the receptor increases the *in vivo* activity, but this happens because the signaling process of hEPO-EPOR complex is fast and as soon as it forms, internalization and degradation begins<sup>73-75</sup>. Because of this, a drop in affinity for the receptor allows hEPO to keep on blood circulation longer and acting over a higher number of target cells.

### Improvement of rhEPO half-life

One of the main roles of hEPO glycosylations is the increase of half-life thanks to a reduction of its glomerular filtration and hepatic clearance. Unfortunately, from a clinical point of view rhEPO does not last long enough in blood, only six to eight hours and it must be administered to patients two to three times per week. Therefore, the costs for the patient or the health system increases even more. After the patent of rhEPO as a biopharmaceutical, presented by Amgen Inc. expired in 2005, a variety of biosimilars and biobetters have been made. To improve rhEPO half-life is the primary goal of different laboratories and companies searching to reduce the number of doses required. The main strategy has been to increase the molecular weight through different ways like the fusion with albumin<sup>76</sup>, fusion with glycosylated peptides<sup>77, 78</sup>, formation of homodimers by linker peptides<sup>79-81</sup>, hyperglycosylation<sup>69, 71</sup> and polyethylene glycol (PEG) conjugation<sup>82, 83</sup>. PEG conjugation strategy has led to the creation of a long-lasting erythropoiesis stimulator like Mircera<sup>®</sup> (Roche) which needs only one administration per month. Although its cost-effectiveness is not clear<sup>84</sup>.

Another approach to increase the molecular weight is the fusion with a Fc portion of an IgG. This strategy has been tested in human and already exists some commercially available products like CTLA4-Fc (Orencia; Abatacept), LFA3-Fc (Amevive) and TNFR-Fc (Enbrel)<sup>85</sup>. Considering this, rhEPO-Fc variants has been generated and produced in CHO, NS/O, PerC6 and BHK cells<sup>86</sup>. A rhEPO fused with a IgG2 Fc portion showed an important extension of half-life and the need of only one dose per week<sup>87, 88</sup>. Genexine, Inc. has created a rhEPO fused with a Fc derived from IgD and IgG4 which passed phase I clinical trial<sup>89</sup> and it is currently under phase II. Salgado E. *et al* (2015)<sup>90</sup> generated and produced in goat's milk an rhEPO fused to a IgG1 Fc. This group reported that the altered glycosylation pattern, of mammary gland, considerably affected rhEPO-Fc

*in vivo* activity, despite of the substantial increase in molecular weight.

## Conclusions

The *in vivo* hEPO activity has a direct relation with its glycosylation and provides advantages like enhanced half-life, a decrease in the affinity for EPOR and other like improved folding, secretion and biodistribution<sup>48, 50, 91</sup>. However, for the hormone recombinant production the different glycosylation patterns, provided by the selected cell line, are an issue. Heterogeneity carries extra steps during downstream. The mandatory use of mammalian cell, for producing rhEPO, increases the final costs. Besides, the glycosylations are not enough to increase the molecular weight for completely avoid glomerular filtration. Currently, different groups are developing groundbreaking approaches to modify the protein and improve its half-life. Although, these strategies have to prove their cost-effectiveness. On the other hand, the approach of "humanizing" different productive organisms could be very useful because it could considerably reduce the production costs of glycosylated rhEPO, which is the "active component" of all the biosimilars and biobetters. Although, the production of new and different "active components" with same erythropoiesis efficacy and less structural complexity could be game-changing.

## Bibliographic references

1. Crantz S. Erythropoietin. *Blood*. 1991;77(3):419-434.
2. Fisher JW. Erythropoietin: pharmacology, biogenesis and control of production. *Pharmacol Rev*. 1972;24(3):459-508.
3. Semenza GL. Regulation of Mammalian O<sub>2</sub> Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999;15(1):551-578. doi:10.1146/annurev.cellbio.15.1.551
4. Recny MA, Scoble HA, Kim Y. Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. Identification of des-arginine 166 erythropoietin. *J Biol Chem*. 1987;262(35):17156-17163.
5. Lai PH, Everett R, Wang FF, Arakawa T, Goldwasser E. Structural characterization of human erythropoietin. *J Biol Chem*. 1986;261(7):3116-3121.
6. Bunn HF. Erythropoietin. *Cold Spring Harb perspectives Med*. 2013;3(3):1-20. doi:10.1101/cshperspect.a011619
7. Fukuda MN, Sasaki H, Lopez L, Fukuda M. Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: the role of carbohydrates. *Blood*. 1989;73(1):84-89. doi:10.1016/S0140-6736(00)85243-5
8. Egrie JC, Strickland TW, Lane J, et al. Characterization and Biological Effects of Recombinant Human Erythropoietin. *Immunobiology*. 1986;172(3-5):213-224. doi:10.1016/S0171-2985(86)80101-2
9. Browne JK, Cohen AM, Egrie JC, et al. Erythropoietin: Gene cloning, protein structure, and biological properties. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51(1):693-702.
10. Yuen C-TT, Storrington PL, Tiplady RJ, et al. Relationships between the N-glycan structures and biological activities of recombinant human erythropoietins produced using different culture conditions and purification procedures. *Br J Haematol*. 2003;121(3):511-526. doi:10.1046/j.1365-2141.2003.04307.x
11. Wasley LC, Timony G, Murtha P, et al. The importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and *in vitro* and *in vivo* biologic activities of erythropoietin. *Blood*. 1991;77(12):2624-2632.
12. Lukowsky W, Painter R. Studies on the role of sialic acid in the physical and biological properties of erythropoietin. *Can J Biochem Cell Biol*. 1972;50(8):909-917.
13. Spivak JL, Hogans BB. The *in vivo* metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. *Blood*. 1989;73(1):90-99.
14. McGonigle RJS, Wallin JD, Shaddock RK. Erythropoietin deficiency and inhibition of erythropoiesis in renal insufficiency. *Kidney Int*. 1984;25(2):437-444. doi:10.1038/ki.1984.36
15. Maxwell AP. Novel erythropoiesis-stimulating protein in the management of the anemia of chronic renal failure. *Kidney Int*. 2002;62(2):720-729. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00474.x
16. Rizzo JD, Seidenfeld J, Piper M, Aronson N, Lichtin A, Littlewood TJ. Erythropoietin: a paradigm for the development of practice guidelines. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2001;10-30. doi:10.1182/asheducation-2001.1.10
17. Lee-Huang S. Cloning and expression of human erythropoietin cDNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*. 1984;81(9):2708-2712. doi:10.1073/pnas.81.9.2708
18. Nagao M, Inoue K, Moon SK, et al. Secretory Production of Erythropoietin and the Extracellular Domain of the Erythropoietin Receptor by *Bacillus brevis*: Affinity Purification and Characterization. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1997;61(4):670-674. doi:10.1271/bbb.61.670
19. Sodayer R. Expression Systems for the Production of Recombinant Pharmaceuticals. *BioDrugs*. 2004;18(1):51-62. doi:10.2165/00063030-200418010-00005
20. Çelik E, Çalık P, Halloran SM, Oliver SG. Production of recombinant human erythropoietin from *Pichia pastoris* and its structural analysis. *J Appl Microbiol*. 2007;103(6):2084-2094. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03448.x
21. Hamilton SR, Davidson RC, Sethuraman N, et al. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science* (80- ). 2006;313(5792):1441-1443. doi:10.1126/science.1130256
22. Nett JH, Gomathinayagam S, Hamilton SR, et al. Optimization of erythropoietin production with controlled glycosylation-PEGylated erythropoietin produced in glycoengineered *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*. 2012;157(1):198-206. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.11.002
23. Gong B, Burnina I, Stadheim TA, Li H. Glycosylation characterization of recombinant human erythropoietin produced in glycoengineered *Pichia pastoris* by mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2013;48(12):1308-1317. doi:10.1002/jms.3291
24. Lee JS, Ha TK, Lee SJ, Lee GM. Current state and perspectives on erythropoietin production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;95(6):1405-1416. doi:10.1007/s00253-012-4291-x
25. Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnol Adv*. 2012;30(5):1158-1170. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.022
26. Zhang P, Lifan Tan D, Heng D, et al. A functional analysis of N-glycosylation-related genes on sialylation of recombinant erythropoietin in six commonly used mammalian cell lines. *Metab Eng*. 2010;12(6):526-536. doi:10.1016/j.ymben.2010.08.004
27. Sasaki H, Bothner B, Dell A, Fukuda M. Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J Biol Chem*. 1987;262(25):12059-12076.
28. Takeuchi M, Takasaki S, Miyazaki H, et al. Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human Erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. 1988;263(8):3657-3663.
29. Tsuda E, Goto M, Murakami A, et al. Comparative Structural Study of N-Linked Oligosaccharides of Urinary and Recombinant Erythropoietins. *Biochemistry*. 1988;27(15):5646-5654. doi:10.1021/bi00415a038
30. Nimtz M, Martin W, Wray V, Klöppel K -D, Augustin J, Conrath HS. Structures of sialylated oligosaccharides of human erythropoietin expressed in recombinant BHK-21 cells. *Eur J Biochem*. 1993;213(1):39-56. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17732.x
31. Watson E, Bhide A, Van Halbeek H. Structure determination of the intact major sialylated oligosaccharide chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology*. 1994;4(2):227-237. doi:10.1093/glycob/4.2.227

32. Hokke CH, Bergwerff AA, Van Dedem GWK, Kamerling JP, Vliegthart JFG. Structural Analysis of the Sialylated N and O Linked Carbohydrate Chains of Recombinant Human Erythropoietin Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells: Sialylation Patterns and Branch Location of Dimeric N-acetylglucosamine Units. *Eur J Biochem.* 1995;228(3):981-1008. doi:10.1111/j.1432-1033.1995.0981m.x
33. Wide L, Bengtsson C. Molecular charge heterogeneity of human serum erythropoietin. *Br J Haematol.* 1990;76(1):121-127. doi:10.1111/j.1365-2141.1990.tb07846.x
34. Rice KG, Takahashi N, Namiki Y, Tran AD, Lisi PJ, Lee YC. Quantitative mapping of the N-linked sialyloligosaccharides of recombinant erythropoietin: Combination of direct high-performance anion-exchange chromatography and 2-aminopyridine derivatization. *Anal Biochem.* 1992;206(2):278-287. doi:10.1016/0003-2697(92)90367-G
35. Storry PL, Gaines Das RE. The International Standard for Recombinant DNA-Derived Erythropoietin: Collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly purified human urinary erythropoietins. *J Endocrinol.* 1992;134(3):459-484. doi:10.1677/joe.0.1340459
36. Storry PL, Tiplady RJ, Gaines Das RE, Rafferty B, Mistry YG. Lectin-binding assays for the isoforms of human erythropoietin: Comparison of urinary and four recombinant erythropoietins. *J Endocrinol.* 1996;150(3):401-412. doi:10.1677/joe.0.1500401
37. Storry PL, Tiplady RJ, Gaines Das RE, et al. Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties. *Br J Haematol.* 1998;100(1):79-89. doi:10.1046/j.1365-2141.1998.00521.x
38. Skibeli V, Nissen-Lie G, Torjesen P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood.* 2001;98(13):3626-3634. doi:10.1182/blood.V98.13.3626
39. Goto M, Akai K, Murakami A, et al. Production of Recombinant Human Erythropoietin in Mammalian Cells: Host-Cell Dependency of the Biological Activity of the Cloned Glycoprotein. *Nat Biotechnol.* 1988;6(1):67-71. doi:10.1038/nbt0188-67
40. Sethuraman N, Stadheim TA. Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol.* 2006;17(4):341-346. doi:10.1016/j.copbio.2006.06.010
41. Aguirre A, Castro-Palomino N, De La Fuente J, Castro FO. Expression of human erythropoietin transgenes and of the endogenous wap gene in the mammary gland of transgenic rabbits during gestation and lactation. *Transgenic Res.* 1998;7(4):311-317. doi:10.1023/A:1008882332133
42. Korhonen VP, Tolvanen M, Hyttinen JM, et al. Expression of bovine beta-lactoglobulin/human erythropoietin fusion protein in the milk of transgenic mice and rabbits. *Eur J Biochem.* 1997;245(2):482-489. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00482.x
43. Mikus T, Malý P, Poplstein M, Landa V, Trefil P, Lidický J. Expression of human erythropoietin gene in the mammary gland of a transgenic mouse. *Folia Biol (Praha).* 2001;47(6):187-195.
44. Sánchez O, Toledo JR, Rodríguez MP, Castro FO. Adenoviral vector mediates high expression levels of human growth hormone in the milk of mice and goats. *J Biotechnol.* 2004;114(1-2):89-97. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.06.009
45. Toledo JR, Sánchez O, Seguí RM, et al. High expression level of recombinant human erythropoietin in the milk of non-transgenic goats. *J Biotechnol.* 2006;123(2):225-235. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.10.019
46. Sánchez O, Montesino R, Toledo JR, et al. The goat mammary glandular epithelial (GMGE) cell line promotes polyfucosylation and N,N'-diacetylglucosaminylation of N-glycans linked to recombinant human erythropoietin. *Arch Biochem Biophys.* 2007;464(2):322-334. doi:10.1016/j.abb.2007.04.027
47. Montesino R, Toledo JR, Sánchez O, et al. Monosialylated biantennary N-glycoforms containing GalNAc-GlcNAc antennae predominate when human EPO is expressed in goat milk. *Arch Biochem Biophys.* 2008;470(2):163-175. doi:10.1016/j.abb.2007.11.019
48. Higuchi M, Oh-eda M, Kuboniwa H, Tomonoh K, Shimonaka Y, Ochi N. Role of sugar chains in the expression of the biological activity of human erythropoietin. *J Biol Chem.* 1992;267(11):7703-7709.
49. Misaizu T, Matsuki S, Strickland TW, Takeuchi M, Kobata A, Takasaki S. Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin. *Blood.* 1995;86(11):4097-4104.
50. Tsuda E, Kawanishi G, Ueda M, Masuda S, Sasaki R. The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur J Biochem.* 1990;188(2):405-411.
51. Imai N, Higuchi M, Kawamura A, et al. Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin in vitro. *Eur J Biochem.* 1990;194(2):457-462.
52. Goldwasser E, Kung CK, Eliason J. On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. 13. The role of sialic acid in erythropoietin action. *J Biol Chem.* 1974;249(13):4202-4206.
53. Mufson RA, Gesner TG. Binding and internalization of recombinant human erythropoietin in murine erythroid precursor cells. *Blood.* 1987;69(5):1485-1490.
54. Takeuchi M, Tasaki S, Shimada M, Kobata A. Role of sugar chains in the in vitro biological activity of recombinant human erythropoietin. *J Biol Chem.* 1990;265(21):12127-12130. doi:10.4052/tigg.2.502
55. Fratantoni J.C. SKB. Evaluation of Recombinant Human Erythropoietin as a Therapeutic Agent. In: Anthony S. Lubiniecki and Susan A. Vargo., ed. *Regulatory Practice for Biopharmaceutical Production.* ; 1994.
56. Dong YJ, Kung C, Goldwasser E. Receptor binding of asialoerythropoietin. *J Cell Biochem.* 1992;48(3):269-276. doi:10.1002/jcb.240480307
57. Morimoto K, Tsuda E, Said AA, et al. Biological and physicochemical characterization of recombinant human erythropoietins fractionated by Mono Q column chromatography and their modification with sialyltransferase. *Glycoconj J.* 1996;13(6):1013-1020. doi:10.1007/BF01053197
58. Kato M, Kamiyama H, Okazaki A, Kumaki K, Kato Y, Sugiyama Y. Mechanism for the nonlinear pharmacokinetics of erythropoietin in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;283(2):520-527.
59. Sulahian R, Cleaver O, Huang LJSJ -s. Ligand-induced EpoR internalization is mediated by JAK2 and p85 and is impaired by mutations responsible for primary familial and congenital polycythemia. *Blood.* 2009;113(21):5287-5297. doi:10.1182/blood-2008-09-179572
60. Walrafen P, Verdier F, Kadri Z, Chrétien S, Lacombe C, Mayeux P. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood.* 2005;105(2):600-608. doi:10.1182/blood-2004-03-1216
61. Suzuki N, Ohneda O, Takahashi S, et al. Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. *Blood.* 2002;100(7):2279-2288. doi:10.1182/blood-2002-01-0124
62. Gross AW, Lodish HF. Cellular trafficking and degradation of erythropoietin and Novel Erythropoiesis Stimulating Protein (NESP). *J Biol Chem.* 2006;281(4):2024-2032. doi:10.1074/jbc.M510493200
63. Nalbant D, Saleh M, Goldman FD, Widness JA, Veng-Pedersen P. Evidence of receptor-mediated elimination of erythropoietin by analysis of erythropoietin receptor mRNA expression in bone marrow and erythropoietin clearance during anemia. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;333(1521-0103 (Electronic)):528-532. doi:10.1124/jpet.109.163568

64. Chapel S, Veng-Pedersen P, Hohl RJ, Schmidt RL, McGuire EM, Widness JA. Changes in erythropoietin pharmacokinetics following busulfan-induced bone marrow ablation in sheep: evidence for bone marrow as a major erythropoietin elimination pathway. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;298(2):820-824.
65. Chapel SH, Veng-Pedersen P, Schmidt RL, Widness JA. Receptor-based model accounts for phlebotomy-induced changes in erythropoietin pharmacokinetics. *Exp Hematol*. 2001;29(4):425-431. doi:10.1016/S0301-472X(01)00614-2
66. Freise KJ, Widness JA, Segar JL, Schmidt RL, Veng-Pedersen P. Increased erythropoietin elimination in fetal sheep following chronic phlebotomy. *Pharm Res*. 2007;24(9):1653-1659. doi:10.1007/s11095-007-9295-3
67. Widness JA, Schmidt RL, Hohl RJ, et al. Change in erythropoietin pharmacokinetics following hematopoietic transplantation. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;81(6):873-879. doi:10.1038/sj.clpt.6100165
68. Darling RJ, Kuchibhotla U, Glaesner W, Micanovic R, Witcher DR, Beals JM. Glycosylation of erythropoietin affects receptor binding kinetics: Role of electrostatic interactions. *Biochemistry*. 2002;41(49):14524-14531. doi:10.1021/bi0265022
69. Egrie JC, Browne JK. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Br J Cancer*. 2001;84(SUPPL. 1):3-10. doi:10.1054/bjoc.2001.1746
70. Syed RS, Reid SW, Li C, et al. Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature*. 1998;395(6701):511-516. doi:10.1038/26773
71. Macdougall IC, Gray SJ, Elston O, et al. Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(11):2392-2395.
72. Elliott S, Egrie JC, Browne JJK, et al. Control of rHuEPO biological activity: The role of carbohydrate. *Exp Hematol*. 2004;32(12):1146-1155. doi:10.1016/j.exphem.2004.08.004
73. Landschulz KT, Noyes AN, Rogers O, Boyer SH. Erythropoietin receptors on murine erythroid colony-forming units: natural history. *Blood*. 1989;73(6):1476-1486.
74. Verdier F, Walrafen P, Hubert N, et al. Proteasomes regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors. *J Biol Chem*. 2000;275(24):18375-18381. doi:10.1074/jbc.275.24.18375
75. Klingmüller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell*. 1995;80(5):729-738. doi:10.1016/0092-8674(95)90351-8
76. Joung C-H, Shin J-Y, Koo J-K, et al. Production and characterization of long-acting recombinant human albumin-EPO fusion protein expressed in CHO cell. *Protein Expr Purif*. 2009;68(2):137-145. doi:10.1016/j.pep.2009.07.003
77. Fares F, Havron A, Fima E. Designing a long acting erythropoietin by fusing three carboxyl-terminal peptides of human chorionic gonadotropin subunit to the N-terminal and C-terminal coding sequence. *Int J Cell Biol*. 2011;7. doi:10.1155/2011/275063
78. Fares F, Ganem S, Hajouj T, Agai E. Development of a long-acting erythropoietin by fusing the carboxyl-terminal peptide of human chorionic gonadotropin  $\beta$ -subunit to the coding sequence of human erythropoietin. *Endocrinology*. 2007;148(10):5081-5087. doi:10.1210/en.2007-0026
79. Dalle B, Henri A, Rouyer-Fessard P, et al. Dimeric erythropoietin fusion protein with enhanced erythropoietic activity in vitro and in vivo. *Blood*. 2001;97(12):3776-3782. doi:10.1182/blood.V97.12.3776
80. Sytkowski AJ, Lunn ED, Davis KL, Feldman L, Siekman S. Human erythropoietin dimers with markedly enhanced in vivo activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(3):1184-1188. doi:DOI 10.1073/pnas.95.3.1184
81. Sytkowski AJ, Lunn ED, Risinger MA, Davis KL. An erythropoietin fusion protein comprised of identical repeating domains exhibits enhanced biological properties. *J Biol Chem*. 1999;274(35):24773-24778. doi:10.1074/jbc.274.35.24773
82. Wang YJ, Hao SJ, Liu YD, et al. PEGylation markedly enhances the in vivo potency of recombinant human non-glycosylated erythropoietin: A comparison with glycosylated erythropoietin. *J Control Release*. 2010;145(3):306-313. doi:10.1016/j.jconrel.2010.04.021
83. Macdougall IC. CERA (Continuous Erythropoietin Receptor Activator): a new erythropoiesis-stimulating agent for the treatment of anemia. *Curr Hematol Rep*. 2005;4(6):436-440.
84. Schmid H. Cost-effectiveness of continuous erythropoietin receptor activator in anemia. *Clin Outcomes Res*. 2014;6:319. doi:10.2147/CEOR.S46930
85. Huang C. Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MIMETI-BODYTM technology. *Curr Opin Biotechnol*. 2009;20(6):692-699. doi:10.1016/j.copbio.2009.10.010
86. Stephen D. Gillies SL. Fc-erythropoietin fusion protein with improved pharmacokinetics US 20090092607 A1. December 2009.
87. Shi X, Yang J, Zhu H, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human EPO-Fc fusion protein in vivo. *McCormick DL, ed. PLoS One*. 2013;8(8):e72673. doi:10.1371/journal.pone.0072673
88. Sun L-HK, Sun BNC, Sun CRY. Fc fusion proteins of human erythropoietin with increased biological activities US6900292. August 2001.
89. Yang SHSI, Yang SHSI, Chung Y-KK. A long-acting erythropoietin fused with noncytolytic human Fc for the treatment of anemia. *Arch Pharm Res*. 2012;35(5):757-759. doi:10.1007/s12272-012-0500-5
90. Salgado ER, Montesino R, Jiménez SP, et al. Post-translational modification of a chimeric EPO-Fc hormone is more important than its molecular size in defining its in vivo hematopoietic activity. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2015;1850(9):1685-1693. doi:10.1016/j.bbagen.2015.04.012
91. Delorme E, Lorenzini T, Giffin J, et al. Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. *Biochemistry*. 1992;31(41):9871-9876.

**Recibido: 16 julio 2018**  
**Aprobado: 3 agosto 2018**

## NEWS AND VIEWS / NOTICIAS Y OPINIONES

# Application of the technique CRISPR/Cas9 in the reduction and permanent inactivation of Huntington's Disease.

## Aplicación de la técnica CRISPR / Cas9 en la reducción e inactivación permanente de la enfermedad de Huntington.

Sofía Abad-Sojos<sup>1</sup>, Odalys Torres<sup>2</sup>, Kerly León Ordóñez<sup>3</sup>.

DOI. 10.21931/RB/2018.03.03.11

**Abstract:** A large amount of polyglutamine repeats gives rise to the neurodegenerative disease that is known as Huntington's disease. Among years, scientists have tried to find a mechanism that can stop the development of being sick but it still being discussed. Here, we review recent data from two experiments associated with the use of CRISPR/Cas9 whose objective is to find the most effective solution for the treatment of this disease. One of them consists of the reduction of expression of the mutant gene while the other seeks the permanent inactivation of this same gene.

**Key words:** CRISPR/Cas9, Huntington Disease, Huntingtin gene, PAM, Mutant gene, Neurodegenerative.

**Resumen:** Una gran cantidad de repeticiones de poliglutamina da lugar a la enfermedad neurodegenerativa que se conoce como enfermedad de Huntington. Durante años, hemos tratado de encontrar un mecanismo que pueda detener el desarrollo de la enfermedad, pero continúa en discusión. Aquí, revisamos datos recientes de dos experimentos asociados con el uso de CRISPR/Cas9 cuyo objetivo es encontrar la solución más efectiva para el tratamiento de esta enfermedad, una consiste en la reducción de la expresión del gen mutante, mientras que la otra busca la inactivación permanente de este mismo gen..

**Palabras clave:** CRISPR/Cas9, Enfermedad de Huntington, Huntingtin, PAM, Gen mutante, Neurodegenerativo.

### Introduction

Huntington's Disease (HD) is a neurodegenerative disease which is progressive and produced by 36 or more repetitions of a specific triplet which is CAG. These repetitions are capable to encode a polyglutamate sequence. This abnormal sequence is produced by the alteration of huntingtin gene (HTT) which is found on the chromosome 4. HD is easily transmitted from sick parents to children, it means that is an autosomal dominant condition. For the following reason, this condition has 50% of probability to transmit the abnormal gene<sup>1</sup>.

The symptoms of HD are manifested in the patients depending on their age because most cases, the appearance of symptoms begin between 30 and 50 years old<sup>2</sup>. At the same time, HD can be divided into three parts depending on their symptoms. There are three phases: early, middle and late. In the early stage, patients present involuntary movements, coordination problems, difficulty to think and depression in low quantities but these symptoms cannot affect completely their daily activities so, they maintain their autonomy. In the middle stage, their coordination and their capacity to think are seriously affected, so, they need help to realize normal activities. In the late stage, patients are confined to bed, need assistance and have difficulties to communicate<sup>1</sup>.

Nowadays, using the CRISPR/Cas9 technique, scientist have achieved alleviate motor deficits and, in another case, they could inactivate permanently the mutant gene that causes HD. The Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) and the endonuclease protein Cas, constitute a mechanism that acts like immune system in prokaryotes, generating a resistance against foreign DNA. This technique is used to edit genomes through insertion, change or deletion of genes using Cas9 that acts like molecular scissors that cut a specific sequence<sup>3</sup>.

CRISPR/Cas9 system works with following components: sgRNA with a guide sequence, Cas9 protein and Protospacer Adjacent Motif (PAM). Scientists create a guide RNA that join with Cas9. Then, PAM triplet which is adjacent to the target site, help to ubicate the Cas9 and bind the guide sequence with the corresponding target sequence. This linkage represents the part of the genome that Cas9 is going to cut. For this, is important to consider that for each organism is needed a specific PAM triplet and a Cas9 protein according to the function that the system must achieve<sup>4</sup>.

Huntington's disease is a dominant disorder because the mutant protein (Huntingtin) which is the factor that provokes the disease. For this reason, current investigations using CRISPR/Cas9 have the objective to avoid the expression of the mutant. The present work contains a review of two cases in which the CRISPR/Cas9 technique is used to produce a reduction and permanent inactivation of mutant gene expression<sup>5,6</sup>.

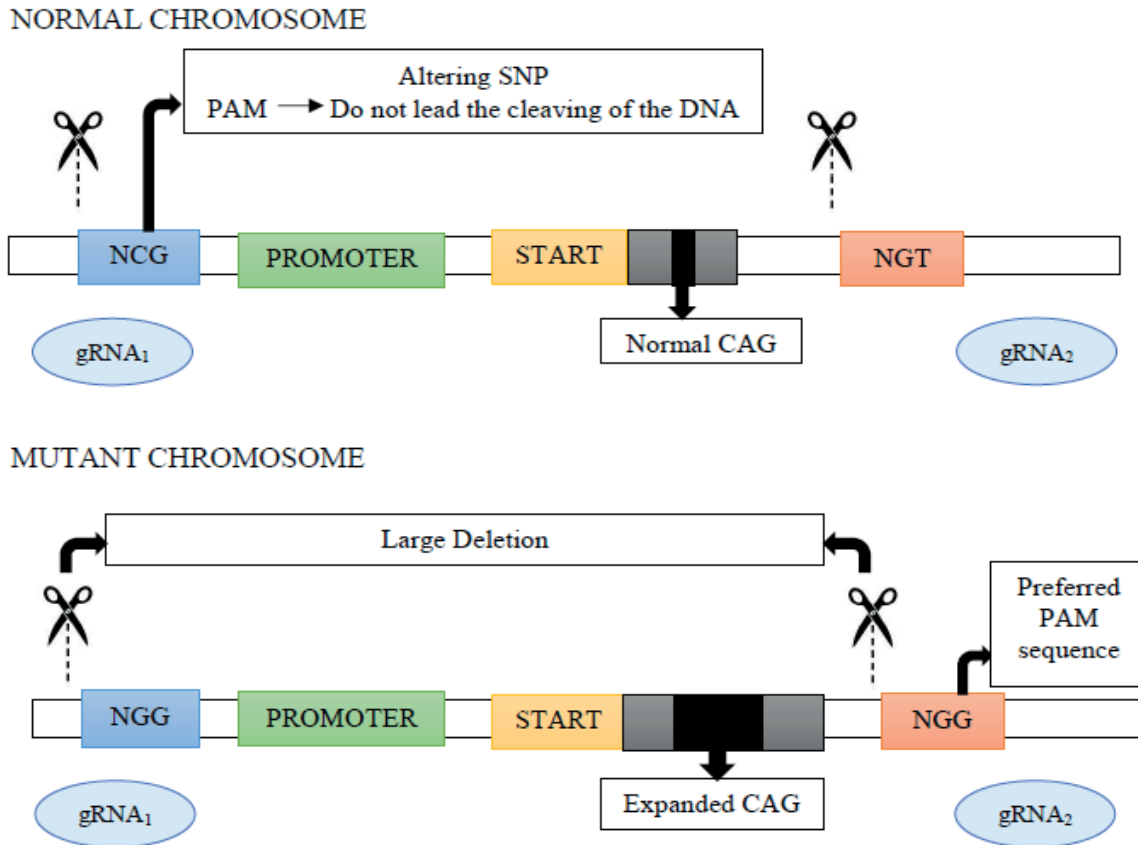
### Reduction of mutant gene expression

Using CRISPR/Cas9 technique to avoid the mutant gene expression, is important to suppress only the mutant part of the Huntingtin gene (HTT). Is demonstrated thought experiments in mice that the complete absence of HTT provokes embryonic death. Additionally, these experiments assure that the reduction of the expression of the mutant Huntingtin gene (mHTT) in neuronal cells of mice, could achieve to lessen coordination problems as those described before<sup>5</sup>.

Using CRISPR/Cas9 efficiently reduce the expression of the mutant Huntingtin gene and can be used for therapeutic approaches but require continuous administration. The neurological symptoms of this disease can be related to vulnerability and selectivity of a specific neurological population. This inhibition of the mutant protein manifestation is a new alterna-

<sup>1</sup> Yachay Tech University, Urcuquí. Ecuador.





**Figure 1.** Permanent inactivation of mutant gene expression is mediated by NGG (Preferred protospacer adjacent motif sequence). In a mutant chromosome is possible NCG and NGT do not allow cleavage. PAM generates CRISPR allele specificity. As a consequence, a large deletion in the mutant chromosome.

tive that can change completely the treatment of this disease that is the result of a lethal gain of function of mutant genes.

#### Permanent inactivation of mutant gene expression

Another experiment that uses CRISPR/Cas9 to obtain a permanent inactivation of mHTT without affecting non-mutant allele. This experiment avoids the expression of mutant Huntingtin protein in cell cultures (Figure 1). This shows that this mechanism can be effective to inactivate HD mutation in animals and humans. Is important to consider that this strategy guarantees that the non-mutant allele is not affected in the process<sup>6</sup>.

Different haplotypes (variations) of the mHTT were tested to find the single-nucleotide polymorphisms (SNPs) that modify the PAM sequence. So, they were achieved to choose the PAM sequence specific for CRISPR/Cas9. Then, they design two sgRNAs that have the function to recognized and bind to the mutant sequence. CRISPR/Cas9 is responsible to cut the binding sequences between sgRNA and mutant permitting avoid the expression of Huntingtin protein in primary fibroblast cells<sup>6</sup>.

Investigators found that applying CRISPR/Cas9 in HD can inactivate the mHTT permanently in the culture of fibroblast cells. To achieve this conclusion in the investigation and have better results, the remove of mHTT with this technique must be carried out before the appearance of symptoms. For this, the use of CRISPR/Cas9 is recommended to use in another late-onset neurodegenerative disease like Alzheimer's and Parkinson's. Before using this technique in human, the effectiveness of all its components and the degree of the benefit to

the patient must be guaranteed<sup>6</sup>.

#### Conclusions

New alternatives that can help in the treatment of this disease have appeared through the years. The development of these new techniques like CRISPR/Cas9 is essential for the investigation of this extremely difficult diseases especially because they are related to the brain. The models described differ in their results. Besides, we can see that the permanent inactivation of the expression of the mutant gene provides the guarantee that the non-mutant allele is not affected.

#### Bibliographic references

1. Nance M, Paulsen J, Rosenblatt A, Wheelock V. A Physician's Guide to the Management of Huntington's Disease [Internet]. Hdsa.org. 2014 [cited 25 November 2017]. Available from: [http://hdsa.org/wp-content/uploads/2015/03/PhysiciansGuide\\_3rd-Edition.pdf](http://hdsa.org/wp-content/uploads/2015/03/PhysiciansGuide_3rd-Edition.pdf)
2. Jhonson A, Paulsen J. Understanding Behavior In Huntington's Disease: A Guide For Professionals [Internet]. Hdsa.org. 2014 [cited 25 November 2017]. Available from: <http://hdsa.org/wp-content/uploads/2015/03/Understanding-Behavior.pdf>
3. 101 Your Guide to Understanding CRISPR [Internet]. Synthego.com. 2017 [cited 26 November 2017]. Available from: <http://www.synthego.com/wp-content/uploads/2016/11/CRISPR-101.pdf>
4. S. Rodriguez, N.S. Vispo, J.E. Simon, CRISPR-Cas9: A Precise Approach to Genome Engineering, (2018) 1-7. doi:10.1177/2168479018762798.

5. Yang S, Chang R, Yang H, Zhao T, Hong Y, Kong H et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease [Internet]. JCI. 2017 [cited 25 November 2017]. Available from: <https://www.jci.org/articles/view/92087>
6. Shin J, Kim K, Chao M, Atwal R, Gillis T, MacDonald M et al. Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. Oxford academic. 2017.

**Recibido: 23 april 2018**

**Aprobado: 13 june 2018**

