

TOMO

3

Diario de Campo

Vol. 13



UNIVERSIDAD COLEGIO
MAYOR DE CUNDINAMARCA

SELLO EDITORIAL

© 2025, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Bogotá, Colombia Diario de campo Vol. 13 Tomo 3
ISBN: 978-958-5198-57-9

María Ruth Hernández Martínez
Rectora

Leonardo Alexander Rodríguez López
Vicerrectora de Investigación, Innovación y Extensión

Wilmer A. Bravo Murillo
Vicerrectora Académica

Sandra Yulieth Moncada Casanova
Vicerrectora Administrativa y Financiera

Comité Editorial Institucional

Leonardo Alexander Rodríguez López
Vicerrector de Investigación, Innovación y Extensión

Luis Guillermo Muñoz Ángulo
Subdirector de Investigación, Innovación y Desarrollo

Claudia Andrea Cruz Baquero
Representante de decanos designada por Consejo Académico

Leonardo Montenegro Martínez
Representante de Editores ante Comité Editorial Institucional

Vilma Yamile Pulido Páez
Profesional Especializado Área de Biblioteca

Mónica Alejandra Quintana Rey
Coordinador Editorial Área del Sello Editorial

Diseño y diagramación
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Se autoriza la reproducción parcial o total de los textos de este documento siempre y cuando se realice la referencia bibliográfica correspondiente. Hecho en Colombia / Made in Colombia

Contenido

Síndrome metabólico en niños y su asociación con obesidad.....	4
Determinación de parámetros cinéticos en la producción de astaxantina a partir de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	24
Determinación de antagonistas como alternativa de control de <i>Fusarium oxysporum</i> en cultivo de Gulupa	55
Estrategias virales para regresión de tumores causados por virus del papiloma bovino	89
Malaria: un problema de salud publica.....	120
Mieloperoxidasa, biosíntesis y acción contra microorganismos y relación con enfermedades inflamatorias	138
Bacterias causantes de sepsis, fisiopatología y respuesta inmune	166
Mecanismos moleculares y genéticos de la degradación de xenobióticos por <i>Pseudomonas extremaustralis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus thuringiensis</i>	187
Heces de <i>Columba livia</i> y su relación con criptosporidiosis	240
Explorando la diabetes inducida en <i>Caenorhabditis elegans</i> y el impacto de un extracto hipoglucemiante.....	264

Síndrome metabólico en niños y su asociación con obesidad

Johanna Marcela Moscoso Gama¹
Carmen Cecilia Almonacid Urrego²
Sonia Marcela Rosas Arango³
Yessica Karolina Isea Calé⁴
Karen Natalia Parra Cortés⁵

INTRODUCCIÓN

Dentro de las principales causas de muerte a nivel global se encuentran las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y las enfermedades respiratorias, que se encuentran asociadas a factores de riesgo modificables tales como la obesidad, el sobrepeso, la diabetes, la inactividad física y el tabaquismo. Muchos de estos factores se fundamentan en una misma base, la malnutrición y los hábitos de vida no saludables, problemas endémicos que afectan a la sociedad moderna y generan un alto número de fallecimientos en el mundo.

¹ MSc. Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes. Bacterióloga y Laboratorista Clínico, Unicolmayor. Docente investigadora. Grupo de investigación ECZA. Directora programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Programa de Bacteriología, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. jperpe@unicolmayor.edu.co

² PhD. Biomedicina, Universidad de León-España. Líder grupo de investigación ECZA, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. calmonacidu@unicolmayor.edu.co.

³ Mg. Gestión ambiental, Universidad de León- UNINI Puerto Rico. Docente investigadora. Grupo de investigación ECZA. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. smrosas@unicolmayor.edu.co

⁴ Estudiante del Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Semillero ECZA. yisca@unicolmayor.edu.co

⁵ Estudiante del Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Semillero ECZA. knparra@unicolmayor.edu.co

El síndrome metabólico (SM), caracterizado como un conjunto de signos clínicos que definen una situación patológica que gira en torno a la obesidad y a la alteración de la función del tejido adiposo, es uno de los factores de riesgo reconocidos para el desarrollo de alteraciones cardiovasculares y diabetes mellitus tipo 2. Su prevalencia varía desde <10% hasta 84%, dependiendo de la región (urbana o rural), del medio ambiente, (Mari, Marval, suárez, & Arteaga, 2012) las variables sociodemográficas de la población estudiada (sexo, edad, raza y etnia), y la definición utilizada del síndrome. La Federación Internacional de Diabetes (IDF) calcula que una cuarta parte de la población adulta del mundo tiene SM, estimándose que, dependiendo del país aproximadamente 1 de cada 4 o 5 adultos lo padecen.

En los últimos años la prevalencia del SM ha aumentado y la edad de aparición ha disminuido, incrementándose en niños el riesgo de desarrollarlo. Si antes se hablaba de pacientes que bordeaban los 50 años, ahora el grupo de riesgo está situado alrededor de 35 años, lo cual obedece a la adopción a edades tempranas de estilos de vida inadecuados. Esta relación directa entre edad y presentación del síndrome metabólico ha sido evaluada, es así como (Koskinen, 2017) y colaboradores en el año reportaron una asociación positiva entre padecer SM y sobrepeso en la niñez, con la posibilidad de desarrollar SM en la edad adulta cuando las condiciones se presentan a partir de los cinco años, así mismo, la presentación de casos de DM2 y enfermedad aterosclerótica en adultos cuando las condiciones se presentan en niños entre 8 y 14 años.

Por otro lado, la obesidad es una patología con una alta prevalencia a nivel mundial. Las estadísticas muestran que para el año 2016 el 39% de la población adulta del mundo se encontraba en condición de sobrepeso y el 13% ya se hallaba en un proceso de obesidad. (OMS, 2019). En la génesis de esta condición se encuentra el exceso de almacenamiento energético originado por el desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético del paciente, alteración que puede ser derivada del sedentarismo, las dietas hipercalóricas, causas ambientales y neuroendocrinas o por predisposición hereditaria

En Colombia se ha detectado un aumento marcado de casos de adultos jóvenes que padecen enfermedades coronarias, situación que alarma a nivel epidemiológico por el problema de salud pública que representa. Por ello se hace necesario realizar una revisión exhaustiva acerca del SM asociado con la obesidad infantil, con el fin de reconocer los factores de riesgo asociados, identificar métodos de diagnóstico específicos y sugerir estrategias primarias de prevención.

SÍNDROME METABÓLICO

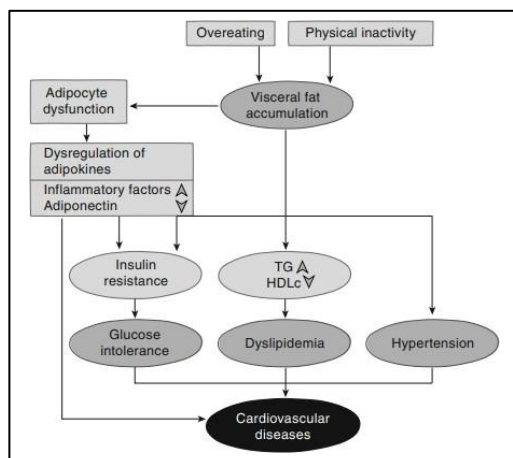
1.1 Definición y fisiopatología

Se define al Síndrome Metabólico (SM) como un conjunto de alteraciones metabólicas o factores de riesgo que predisponen al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular. Dentro de estas alteraciones se encuentran obesidad central o abdominal, hipertensión, hiperglucemia, hipertrigliceridemia y un descenso en el colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad (Pineda, 2008).

Anteriormente era conocido como síndrome X, ya que el conjunto de estas alteraciones se presentaba todas en un mismo individuo. Reaven y otros en 1988, postularon que la resistencia de insulina es la base del síndrome X, por lo que hoy en día se conoce también como “síndrome de resistencia a la insulina”. También en 1998 la OMS introdujo el término síndrome metabólico como entidad diagnóstica con criterios definidos. Finalmente, en su informe de 2001 el National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (ATP III) empleó este término, convirtiéndose así en la definición más utilizada (Pineda, 2008).

La mayoría de los estudios que se han realizado señalan que el factor promotor que induce a desequilibrios metabólicos y la aparición de resistencia a la insulina es la obesidad, en especial la obesidad de predominio central o abdominal expresada por una mayor circunferencia de la cintura y el incremento en el cociente cintura-talla. Como se observa en la Figura 1, esta acumulación de grasa visceral es promovida por un alto consumo calórico unido a la inactividad física (Arroyo-Johnson & Mincey , 2016) (Figura 1).

Figura 1: Fisiopatología del SM. (Springer,2014)



Hoy en día se sabe que el tejido adiposo no solo constituye una reserva energética expresada en forma de triglicéridos, sino que también cumple funciones endocrinas. Dentro de ellas se encuentran la síntesis del inhibidor del activador del plasminógeno, la adiponectina y algunas adipocinas como IL-6, IL-1, TNF- α . Así mismo, secreta proteínas que participan en la lipólisis y la lipogénesis (Gutiérrez-Ruiz, Velázquez-Paniagua, & Prieto-Gómez, 2011). En el SM el incremento en la lipólisis conlleva una producción acelerada de ácidos grasos libres y la desregulación de las adipocinas, lo que conduce al desarrollo de resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y enfermedad cardiovascular (Artola Menéndez, Duelo Marcos, & Escribano Ceruelo, 2009).

PREVALENCIA

Es difícil estimar la prevalencia del síndrome metabólico en niños porque en sus múltiples definiciones se han utilizado criterios diferentes, estimándose que oscila entre el 0,2% y el 38,9% (Agudelo, y otros, 2014). En una revisión sistemática realizada en 85 estudios que abordaron esta problemática en niños, la mediana de la prevalencia del síndrome metabólico en la población en general fue del 3,3% (rango 0-19,2%), en niños con sobrepeso de 11,9% (rango 2,8-29,3%) y en poblaciones obesas de 29,2% (rango 10–66%). Para las poblaciones no obesas y sin sobrepeso, el rango fue de 0 a 1% (Friend, Craig, & Turner, 2013). Cerca del 90% de los niños y adolescentes obesos tienen al menos una característica del síndrome metabólico (Cook, Weitzman, Auinger, Nguyen, & Dietz, 2003). La prevalencia también es mayor en los hispanos en comparación con la población caucásica o afroamericana (Wittcopp & Conroy, 2016) (Silveira, Buonani, Monteiro, Mello Antunes, & Freitas Júnior, 2013). Para Latinoamérica los datos oscilan entre 16,8% y 49% y para Colombia, entre 12,3% y 76% (de Lleras, 2010). En Asia datos recopilados en 1039 estudiantes universitarios y 953 estudiantes de secundaria iraníes, muestran una prevalencia de SM de 13,2% en jóvenes y 12,3% en estudiantes de secundaria, con mayor presencia entre los estudiantes de la zona urbana (5,3%) vs. la zona rural (3,3%). Los componentes del síndrome con mayor frecuencia en la población en general en este estudio fueron el sobrepeso y la obesidad (Ahmadi, y otros, 2014).

DIAGNÓSTICO

Los componentes del SM se han definido según diferentes guías y consensos. Dentro de los criterios utilizados para el diagnóstico de Síndrome Metabólico en adultos se encuentran los de la OMS, ATP III, IDF y AAC (Pineda, 2008) (Figura 2).

Figura 2: Componentes del síndrome metabólico en adultos, considerando su definición. (Pineda 2008)

	ATP III	OMS	AACE	IDF
Triglicéridos mayor o igual a 150 mg/dL	X	X	X	X
HDL menor de 40 mg/dL en varones y 50 mg/dL en mujeres	X	X	X	X
Presión arterial mayor de 130/85 mmHg	X	X	X	X
Insulino resistencia (IR)		X		
Glucosa en ayunas mayor de 100 mg/dL	X		X	X
Glucosa 2 h: 140 mg/dL			X	
Obesidad abdominal	X			X
Índice de masa corporal elevado		X	X	
Microalbuminuria		X		
Factores de riesgo y diagnóstico	3 más IR	Más de 2	Criterio clínico	Obesidad abdominal

ATP III: National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (ATP III), OMS: Organización Mundial de la Salud, AACE: American Association of Clinical Endocrinologists, IDSF: International Diabetes Federation

Al contrario que para los adultos, no existe hoy en día en el mundo un criterio definido ni específico para el diagnóstico del SM en niños y adolescentes, utilizándose los dictaminados por estudios científicos que establecieron puntos de corte para cada criterio del Síndrome, acoplados a la población pediátrica. Situación que conduce a que se presente gran disparidad a la hora del diagnóstico (Pineda, 2008). Los criterios más utilizados son los establecidos por Weiss y col (Weiss, y otros, 2004), López Capapé y col (López-Capapé, y otros, 2006), Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD) (Guzman , y otros, 2009) y el panel de expertos del Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre (NHBLIMC y NHLBICC) (FOR & CHILDREN, 2011), los cuales se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de síndrome metabólico en niños y adolescentes (autoría propia)

CRITERIO		Weiss y Col	Lopez Capapé y Col	Butte y Col	Guías ALAD	NHLBIMC	NHLBICC
Obesidad	CC	No aplica	No aplica	CC: > percentil 90 para la edad, sexo y etnia	CC: > percentil 90 para la edad, sexo y etnia	No aplica	ICC Cut point: CC \geq percentil 90 a < percentil 95 High: \geq percentil 95
	IMC	IMC \geq 2SDS o IMC \geq percentil 197 para edad y género	IMC \geq 2SDS (para edad y sexo)	No aplica	No aplica	IMC Cut point: IMC \geq percentil 85 a < percentil 95 High: \geq percentil 95	No aplica
Dislipidemia	TG	Percentil 95	\geq 110 mg/dL	TG > percentil 90 para la edad, sexo y grupo étnico	\geq TG > 100 mg/dl para la edad, sexo y grupo étnico	Cut point: 0 - 9 años: \geq 75 a < 100; Mayor de 10 años: \geq 90 a < 130 High: 0 - 9 años: \geq 100; Mayores de 10 años: \geq 130	Cut point: 0 - 9 años: \geq 75 a < 100; Mayor de 10 años: \geq 90 a < 130 High: 0 - 9 años: \geq 100; Mayores de 10 años: \geq 130

	C-HDL	TG > percentil 195 c-HDL ≤ percentil 5	c-HDL ≤ 40	c-HDL ≤ percentil 10 para edad y sexo	c-HDL ≤ 40 mg/dL	HDL Cut point: c-HDL ≥ 40 a ≤ 45 High: HDL >45	HDL Cut point: c-HDL ≥ 40 a ≤ 45 High: HDL >45
	Presión arterial (PA)	PA ≥ percentil 195 para edad y género	PA > percentil 95 (para edad, sexo y altura para edad y género)	PA > percentil 90 para la edad, sexo y estatura	Sistólica mayor a 130 mm/hg, Diastólica mayor a 85 mm/hg	Cut point: PA ≥ percentil 90 a < percentil 95 High: PA ≥ percentil 95	Cut point: PA ≥ percentil 90 a < percentil 95 High: PA ≥ percentil 95
	Glicemia	PTGO: 2 hrs: ≥ 140 - <200	Ayunas ≥ 110 - <126 PTGO: 2 hrs: ≥ 140 - <200)	Ayunas: ≥100 mg/dL	Ayunas: ≥100 mg/dL	Cut point: Ayunas ≥ 100 a < 126	Cut point: Ayunas ≥ 100 a < 126
	Edad	4-20 años	4-18 años	4-19 años	6-18 años	0-21 años	0-21 años

CC: circunferencia de cintura. IMC: Índice de masa corporal. TG: triglicéridos. PTGO: prueba de tolerancia oral a la glucosa. C-HDL: colesterol- Lipoproteína de alta densidad. PA: presión Arterial.

DMT2: diabetes mellitus tipo 2. ATG: alteración tolerancia a la glucosa.

OBESIDAD

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad como una patología caracterizada por una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal, visible y cuantificable, que se origina como consecuencia de una alteración en el equilibrio energético entre las calorías consumidas y las gastadas, debido a que se aumenta la ingesta de alimentos de alto contenido calórico y se disminuye la actividad física (OMS, 2019).

De esta manera podemos entender que la obesidad esté catalogada como una enfermedad crónica no trasmisible, que muestra un desequilibrio entre el gasto de energía y el consumo de calorías de un individuo, desequilibrio que se encuentra de manera desproporcionada en el organismo de quien la padece. Es decir, que esta enfermedad evidencia un exceso de almacenamiento de energía en forma de grasa que posteriormente genera fallas en la homeostasis del sistema, condición que produce como consecuencia una mayor carga y producción de adipocitos en el individuo. A su vez, los procesos metabólicos involucrados provocan que el organismo no guarde un correcto equilibrio con el depósito proteico ni los hidratos de carbono, condición que genera una serie de daños a nivel fisiológico y neuroendocrino en el organismo afectado, que traen como principal consecuencia que éste no posea la capacidad de regular los aportes y el gasto y/o almacenamiento de las reservas de energía (Apovian, 2016).

En Colombia, la Ley 1355 de 2009 define la obesidad y las enfermedades crónicas no transmisibles asociadas a ésta como una prioridad de salud pública, decretando las medidas y estrategias necesarias para controlarla, atenderla y prevenirla, ya que se encuentra como una causa directa de otro tipo de enfermedades y aumenta considerablemente la tasa de mortalidad de los colombianos (INS, 2019).

En la actualidad muchos países en vía de desarrollo se enfrentan a una situación de malnutrición y las tasas de obesidad lo demuestran. En ello influye el que, por ser una enfermedad no trasmisible y por la existencia de sistemas de creencias que incluso asocian al individuo obeso con un individuo sano, tiende a subestimarse. Adicional a esto, el riesgo de padecer obesidad puede estar directamente relacionado con factores de carácter hereditario, es decir con aquellas características que se transfieren de una generación a otra como consecuencia de factores conductuales y/o biológicos (Speiser , y otros, 2005).

Los factores medioambientales también intervienen en gran medida en el desarrollo de la obesidad. Dentro de ellos se encuentran la disponibilidad de alimentos altamente calóricos o la necesidad disminuida de realizar algún tipo de actividad física, influencia que se amplifica por la predisposición genética. Existen diferentes variables en la respuesta que presentan los individuos frente a la dieta y a los factores ambientales, todo esto dado principalmente por las características individuales que tienen los mecanismos de control del peso corporal. Todo ello conduce a que la obesidad sea considerada como un problema de salud pública grave que afecta cualquier rango de

edad sin importar género, edad, raza o estrato socioeconómico, además de llevar consigo un número importante de enfermedades asociadas que pueden aumentar dramáticamente las cifras de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Morales Clavijo & Carvajal Garcés, 2010).

CLASIFICACIÓN DE LOS TIPOS DE OBESIDAD

A nivel general existen diferentes formas de clasificar la obesidad, las cuales se describen en las tablas que se presentan a continuación:

Tabla 2. Clasificación de obesidad en adultos según el IMC (Moreno, 2012)

Obesidad según el Índice de Masa Corporal (IMC)		
Clasificación	Rango	Valor IMC
Bajo peso	–	<18.5
Normal	–	18.5- 24.9
Sobrepeso	–	25.0- 29.9
Obesidad	I	30.0 – 34.9
Obesidad	II	35.0 – 39.9
Obesidad extrema	III	> 40

Tabla 3. Clasificación de la obesidad según su origen (Ferragut Martí , 2001)

Obesidad según su origen	
Obesidad exógena	Obesidad endógena

Es el tipo de obesidad que se genera debido a un exceso en el consumo de calorías.	Se origina como consecuencia de una serie de alteraciones metabólicas, tales como la obesidad hipotiroidea provocada por disfunción de la tiroides o la obesidad gonadal generada por deficiencia de las hormonas sexuales.
--	---

Tabla 4. Clasificación de obesidad según la distribución de grasas (Ferragut Martí , 2001)

Obesidad según la distribución de la grasa	
Obesidad androide	También llamada obesidad central o visceral, se caracteriza por el acumulo de la grasa en el tronco y abdomen dando un aspecto tipo “manzana”. Presenta complicaciones como aterosclerosis, hipertensión, diabetes mellitus, hiperinsulinismo, hipercolesterolemia y enfermedad coronaria, entre otros.
Obesidad ginoide	También llamada obesidad periférica, caracterizada por el acumulo de grasa en la región gluteofemoral dando un aspecto tipo “pera”. Presenta complicaciones como litiasis biliar y trastornos venosos.
Obesidad generalizada	No presenta una distribución regional de la grasa.

Tabla 5. Clasificación de obesidad según el tipo celular (Ferragut Martí , 2001)

Clasificación según el tipo celular	
Obesidad hiperplásica	Presenta una población aumentada de adipocitos en tamaño normal. Siendo la más común en niños y adolescentes.
Obesidad hipertrófica	Presenta un número normal de adipocitos, pero de mayor tamaño y con más grasa, es más común en los adultos.

OBESIDAD EN LA INFANCIA

La obesidad infantil constituye uno de los problemas de salud pública más graves del siglo XXI (Ferragut Martí , 2001). La OMS menciona que desde el año 1975 y hasta el año 2016 la prevalencia mundial se ha casi triplicado observándose que, mientras que en 1975 menos de un 1% de niños y adolescentes de 5 a 19 años padecían obesidad, en 2016 esta cifra se incrementó a 124 millones (un 6% de las niñas y un 8% de los niños). Así mismo, para el año 2018 la OMS reportó que unos 41 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso o eran obesos (OMS, 2019).

Si bien el sobrepeso y la obesidad en niños eran considerados como un problema propio de los países de ingresos altos, en la actualidad ambos trastornos se han incrementado en los países de ingresos bajos y medianos, en particular en los entornos urbanos (Gregory , 2019) . Ejemplo de ello es África donde el número de menores de 5 años con sobrepeso ha aumentado cerca de un 50% desde el año 2000. No es raro encontrar la desnutrición y la obesidad coexistiendo en el mismo país, la misma comunidad y el mismo hogar. Esto demuestra que el sobrepeso y la obesidad están vinculados con un mayor número de muertes que la insuficiencia ponderal. En general, hay más personas obesas que con peso inferior al normal (Jaacks , y otros, 2019).

Colombia se encuentra en medio de una transición nutricional, donde la obesidad y el sobrepeso está en ascenso permanente año tras año, afectando a más de la mitad de la población adulta (56,4%) y cerca del 17,80% del total de niños y adolescentes (Tanuz , Arnedo , & Alvis-Guzman, 2015) (Tauf F, Marrugo A. 2015). La Encuesta Nacional

de la Situación Nutricional en Colombia (ENSIN-2015) muestra una prevalencia de obesidad infantil de 6.3%, cifra que concuerda con la reportada para el mundo (6.2%). De otro lado, el exceso de peso en escolares pasó de 18,8% en 2010 a 24,4 % en 2015 con un incremento específico para la etnia afrodescendiente de 20.9%, muy cerca del valor porcentual del país (MinSalud, 2018) . Como principales causas se pueden evidenciar las condiciones de seguridad alimentaria de los hogares, el nivel de escolaridad de la cabeza de hogar y la presencia marcada de antecedentes de obesidad en la familia, los cuales son determinantes de la probabilidad de padecer sobrepeso u obesidad (Tanuz , Arnedo , & Alvis-Guzman, 2015).

A nivel general, los cambios de algunos determinantes de salud tales como los hábitos alimenticios y el estilo de vida cada vez más sedentaria por el avance tecnológico, dan como resultado niños obesos y con sobrepeso que padecen de trastornos relacionados a esta condición en la edad adulta y aumentan las probabilidades de padecer de enfermedades no transmisibles como la diabetes, enfermedades cardiovasculares y trastornos del aparato locomotor (Gregory , 2019).

En la sexta semana de gestación ya es posible la identificación de adipocitos en el embrión humano. En esta etapa un gran porcentaje de la grasa se acumula en forma de tejido adiposo marrón que está conformado por adipocitos con función termogénica específica, a diferencia de la reserva de tejido adiposo blanco que está involucrada en el almacenamiento de energía en forma de triglicéridos (Martos-Moreno , Kopchick, & Argente, 2003). Un gran determinante del proceso de obesidad es la secreción de mediadores proinflamatorios como las adipocinas, que conducen a un estado inflamatorio crónico de bajo grado que altera funciones propias de diversos sistemas necesarios para su buen desarrollo, entre ellos la alteración en el dominio y cambios histológicos, metabólicos y endocrinos (Spalding , y otros, 2008).

El número de adipocitos es un determinante importante de la masa magra en adultos, sin embargo, en los niños y adolescentes se presenta un aumento gradual de tejido blanco con tasas de proliferación de adipocitos superior en personas con obesidad con respecto a las delgadas, lo cual da a entender que durante estas etapas se establece la adiposidad con la que cursara el adulto, sin importar si este haya tenido una pérdida de peso significativa. Ello da como resultado que la obesidad se instaure precozmente generando una tasa de reclutamiento de pre-adipocitos más acelerada que aunada a la existencia de un alto grado de hipertrofia que atenúa el patrón de secreción de adipoquinas durante la infancia, aumenta el riesgo de obesidad severa y de desarrollar comorbilidades en etapas posteriores de la vida (Apovian, 2016).

VALORACIÓN DEL GRADO DE OBESIDAD

El índice de masa corporal (IMC) es un indicador de fácil acceso empleado para evaluar el estado nutricional de un individuo y realizar la valoración del riesgo y posibles complicaciones vasculares asociadas al sobrepeso y la obesidad. Se obtiene al realizar la división del peso (medido en kilogramos) entre la talla (medida en metros) elevado al cuadrado y se interpreta a través de curvas de crecimiento específicas que se relacionan con la edad y el sexo. Así mismo, muestra la masa libre de grasa, la masa ósea, la masa muscular y ofrece la posibilidad de realizar, a través de índices sencillos, una valoración de adiposidad corporal que puede ser utilizada posteriormente como herramienta de clasificación diagnóstica a edades tempranas (Lecube , y otros, 2017).

Acorde con el índice de masa corporal los individuos adultos pueden clasificarse como (Lecube , y otros, 2017):

- Sin sobrepeso: Índice de masa corporal < al 85 percentil.
- Sobrepeso: Índice de masa corporal > al percentil 85 y < al percentil 95.
- Obeso: Índice de masa corporal > al percentil 95 (Ministerio de Salud de la Nación 2013).

Aunque el IMC proporciona la medida más útil del sobrepeso y la obesidad en la población adulta independiente de la edad, en el caso de los niños es necesario tener en cuenta la edad para definirlos. Para los niños con un intervalo de edad de 5 a 19 años, el sobrepeso y la obesidad se definen de la siguiente manera (Styne, y otros, 2017):

- Sobrepeso: IMC para la edad con más de una desviación típica por encima de la mediana establecida en los patrones de crecimiento infantil de la OMS.
- Obesidad: IMC con más de dos desviaciones típicas por encima de la mediana establecida en los patrones de crecimiento infantil de la OMS.

En el caso específico de la población colombiana, la Resolución 2465 de 2016 indica las curvas que deben utilizarse para evaluar la masa corporal. Acorde con ellas, los jóvenes que se encuentran por encima del percentil 85 para la edad y género son clasificados con sobrepeso y aquellos que se encuentran por encima del percentil 95 como obesos (MinSalud, Resolución No. 2165 de 2016, 2016).

RELACIÓN ENTRE SÍNDROME METABÓLICO Y OBESIDAD INFANTIL

Existe una relación positiva entre el sobrepeso y la obesidad con la aparición de SM, ya que ambos son factores de riesgo importantes para el desarrollo de dicha patología tanto en niños (Afshin, Reitsma , & Murray , 2017) como en adultos (Ogden , y otros, 2016) .

Las evidencias demuestran que el síndrome se presenta con mayor frecuencia en personas con sobrepeso, afectando a relativamente pocos (3-4%) jóvenes de peso normal, pero según la definición utilizada, al 26-50% de los niños y adolescentes obesos (Marcovecchio & Chiarelli , 2013). Por lo tanto, es importante reconocer que aunque no todos los jóvenes obesos desarrollan el síndrome metabólico, hasta el 90% de los niños y adolescentes obesos tendrán al menos un componente (Cook, Weitzman, Auinger, Nguyen, & Dietz , 2003). A diferencia de los caucásicos blancos, las personas de origen étnico hispano, del Medio Oriente, asiático o afroamericano tienen un riesgo particular de sufrir complicaciones metabólicas asociadas con la obesidad (Kong , y otros, 2013) (Wittcopp & Conroy, *Metabolic Syndrome in Children and Adolescents*, 2016) (Silveira, Buonani, Monteiro , Mello Antunes , & Freitas Júnior, 2013) .

La relación de la obesidad infantil con la resistencia a la insulina, condición implicada en la génesis del síndrome metabólico, está bien establecida. En niños y adolescentes obesos se ha demostrado que la prevalencia del síndrome aumenta de forma independiente con el grado de obesidad y con el aumento del grado de resistencia a la insulina (Weiss, y otros, 2004). Así mismo, las evidencias muestran que una mayor adiposidad se asocia con una mayor agrupación de factores de riesgo para el síndrome (Zabarsky , y otros, 2018), observándose que en los niños obesos un mayor incremento en el peso se asocia con una reducción significativa de la sensibilidad a la insulina junto con un empeoramiento de todos los componentes del síndrome metabólico (Reinehr, Kleber, & Toschke, 2009). Por el contrario, independientemente de los criterios utilizados para identificar SM y resistencia a la insulina, la prevalencia del síndrome en adolescentes y niños delgados es insignificante (Cook, Auinger, Li, & Ford , 2008) (Ahrens, y otros, 2014)

El impacto de la obesidad en el desarrollo de resistencia a la insulina y la presencia de factores de riesgo para SM no está simplemente relacionado con la presencia sino también con la duración de la exposición al exceso de adiposidad. Específicamente, el

inicio más temprano y la duración más prolongada de la obesidad se asocian con un mayor riesgo de presencia de resistencia a la insulina (Zamrazilova , Weiss , Hainer, & Aldhoon-Hainerová, 2016). La obesidad infantil tiende a seguir hasta la edad adulta, y hasta el 80% de los niños obesos eventualmente se convertirán en adultos obesos, por lo que la obesidad de inicio temprano tiene un impacto más fuerte en los efectos potenciales deletéreos de la resistencia a la insulina (Apovian, 2016).

Todas estos hallazgos evidencian que las alteraciones metabólicas impulsadas por la resistencia a la insulina son muy raras en niños y adolescentes no obesos y destacan aún más el papel principal de la obesidad como motor del desarrollo del síndrome metabólico en la infancia. Así mismo, fundamentan el que las reducciones en la sensibilidad a la insulina que estaban estrecha y significativamente relacionadas con el aumento de peso, emerjan ahora como los mejores predictores del deterioro de la tolerancia a la glucosa (Weiss,, y otros, 2005).

ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN

Debido a que en la etapa escolar y los primeros años de la vida adulta se adquieren hábitos de vida modificables que incrementan el riesgo de desarrollar SM y obesidad, tales como tabaquismo, alcoholismo y sedentarismo, los programas de prevención primaria son relevantes ya que tienen como objetivo fundamental evitar la enfermedad. La medida prioritaria en la prevención primaria del SM y la obesidad es la intervención sobre los hábitos de vida: alimentación saludable, aumento de la actividad física y disminución del sedentarismo, actuando lo más precozmente posible y dirigiendo las recomendaciones a toda la familia (Ramírez-Vélez , y otros, 2017).

Acorde con la Organización Mundial de la Salud uno de los pilares de la actual pandemia de obesidad y SM es la malnutrición, definida como las carencias, excesos y desequilibrios en la ingesta calórica y de nutrientes Esta misma organización considera que la causa fundamental del sobrepeso y la obesidad infantil es el desequilibrio entre la ingesta y el gasto calóricos, originado por factores como el cambio dietético mundial hacia un aumento de la ingesta de alimentos hipercalóricos con abundantes grasas y azúcares, pero con escasas vitaminas, minerales y otros micronutrientes saludables y la tendencia a la disminución de la actividad física debido al aumento de la naturaleza sedentaria de muchas actividades recreativas, así como el cambio en los modos de transporte y la creciente urbanización (OMS, 2019).

Dentro de las recomendaciones de prevención primaria aconsejadas por la OMS para controlar la obesidad y el SM en la infancia y adolescencia se encuentran las siguientes (OMS, 2019):

- Brindar atención gestacional y prenatal
- Mantener a lo largo de la vida una dieta sana que incluya el consumo diario de 50%-60% de hidratos de carbono, 25%-35% de grasas y entre un 10% y un 15% de proteínas.
- Promover la actividad física en la primera infancia y en los niños en edad escolar. Un estudio realizado por Ramírez-Vélez R, y col en el 2017 sobre la relación entre ir en bicicleta a la escuela, la condición física y síndrome metabólico en niños y adolescentes colombianos, mostró que utilizar la bicicleta con regularidad como medio de transporte puede estar asociado con una mejor condición física y una menor incidencia de síndrome metabólico que el transporte pasivo, especialmente en las niñas. (Ramírez, 2017)
- Controlar el peso

Específicamente en el ámbito colombiano, en año el 2009 se expide la ley 1355 (Mineducación, 2009) donde además de definir la obesidad como una enfermedad crónica de salud pública se promueven estrategias para una alimentación balanceada y saludable, dentro de las que se incluyen las siguientes:

- Los establecimientos educativos públicos y privados del país en donde se ofrezcan alimentos para el consumo de los estudiantes deberán garantizar la disponibilidad de frutas y verduras.
- Los centros educativos públicos y privados del país deberán adoptar un Programa de Educación Alimentaria siguiendo los lineamientos y guías que desarrollen el Ministerio de la Protección Social y el Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, para promover una alimentación balanceada y saludable, de acuerdo con las características culturales de las diferentes regiones de Colombia.

CONCLUSIÓN

Dentro de los factores de riesgo que tienen un mayor peso en la generación de la obesidad y el síndrome metabólico en niños y adolescentes se encuentran la malnutrición y el sedentarismo, condiciones que son modificables. Por ello es de gran importancia implementar programas de prevención dirigidos a esta población en específico, con el fin de disminuir la morbimortalidad futura derivada de estas dos

patologías y aminorar los costos que para los sistemas de salud implica el tratamiento de las enfermedades crónicas que generan.

REFERENCIAS

- Afshin, A., Reitsma, M., & Murray, C. (2017). Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries. *The New England journal of medicine*, 377(15), 1496-1497.
- Agudelo, G., Bedoya, G., Estrada, A., Patiño, F., Muñoz, A., & Velasquez, C. (2014). Variations in the prevalence of metabolic syndrome in adolescents according to different criteria used for diagnosis: which definition should be chosen for this age group? *Metabolic syndrome and related disorders*, 12(4), 202-209.
- Ahmadi, A., Gharipour, M., Nouri, F., Kelishadi, R., Sadeghi, M., & Sarrafzadegan, N. (2014). Association between adolescence obesity and metabolic syndrome: Evidence from Isfahan Healthy Heart Program. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 18(4), 569.
- Ahrens, W., Moreno, L., Mårild, S., Molnár, D., Siani, A., De Henauw, S., & Lissner, L. (2014). Metabolic syndrome in young children: definitions and results of the IDEFICS study. *International journal of obesity*, 38(2), S4-S14.
- Apovian, C. (2016). Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care*, 22(Suppl 7), s176-85.
- Arroyo-Johnson, C., & Mincey, K. (2016). Obesity Epidemiology Worldwide. *Gastroenterol Clin North Am*, 45(4), 571-579.
- Artola Menéndez, S., Duelo Marcos, M., & Escribano Ceruelo, E. (2009). Síndrome metabólico. *Pediatría Atención Primaria*, 11, 259-277.
- Cook, S., Auinger, P., Li, C., & Ford, E. (2008). Metabolic syndrome rates in united states adolescents, from the national health and nutrition examination survey, 1999–2002. *The Journal of pediatrics*, 152(2), 165-170.
- Cook, S., Weitzman, M., Auinger, P., Nguyen, M., & Dietz, W. (2003). Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 157(8), 821-827.

- de Lleras , C. (2010). *Encuesta Nacional de la situación nutricional en Colombia 2010*.
- Ferragut Martí , J. (2001). Obesidad en el niño. Concepto y clasificación. En S. E. *Pediátrica, Trastornos* (págs. 29-36). Barcelona: Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica.
- FOR , E., & CHILDREN, R. (2011). Expert panel on integrated guidelines for cardiovascular health and risk reduction in children and adolescents: summary report. *Pediatrics*, *128*(Suppl 5), S213.
- Friend, A., Craig, L., & Turner, S. (2013). The prevalence of metabolic syndrome in children: a systematic review of the literature. *Metabolic syndrome and related disorders*, *11*(2), 71-80.
- Gregory , J. (2019). Prevention of obesity and metabolic syndrome in children. *Frontiers in Endocrinology*, *10*, 669.
- Gutiérrez-Ruiz, J., Velázquez-Paniagua, M., & Prieto-Gómez, B. (2011). El tejido adiposo como órgano maestro en el metabolismo. *Revista de endocrinología y nutrición*, *19*(4), 164-162.
- Guzman , J., Tamayo , M., León , R., Sinay , I., Gil, J., de Loredó , L., & Ferreira, S. (2009). Guía ALAD “Diagnóstico, control, prevención y tratamiento del Síndrome Metabólico en Pediatría. *Rev Asoc Am Diabetes*, *17*(1), 16-31.
- INS. (2019). *Ley 1355 de octubre 14 de 2009*. Bogotá: Instituto Nacional de Salud. Obtenido de https://www.mineducacion.gov.co/1759/w3-article-381525.html?_noredirect=1#:~:text=Ley%201355%20de%20octubre%2014%20de%202009%3B%20por%20medio%20de,su%20control%2C%20atenci%C3%B3n%20y%20prevenci%C3%B3n.
- Jaacks , L., Vandevijvere , S., Pan , A., McGowan , C., Wallace , C., Imamura , F., & Mozaffarian , D. (2019). The obesity transition: stages of the global epidemic. *Lancet Diabetes Endocrinol*, *7*(3), 231-240.
- Kong , A., Xu , G., Brown, N., So , W., Ma , R., & Chan , J. (2013). Diabetes and its comorbidities—where East meets West. *Nature Reviews Endocrinology*, *9*(9), 537.
- Lecube , A., Monereo , S., Rubio , M., Martínez-de-Icaya , P., Martí, A., Salvador, J., & García Almeida , J. (2017). Prevención, diagnóstico y tratamiento de la obesidad. Posicionamiento de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad de 2016. *Endocrinol. diabetes nutr.(Ed. impr.)*, 15-22.

- López-Capapé, M., Alonso, M., Colino, E., Mustieles, C., Corbatón, J., & Barrio, R. (2006). Frequency of the metabolic syndrome in obese Spanish pediatric population. *European journal of endocrinology*, 155(2), 313-319.
- Marcovecchio, M., & Chiarelli, F. (2013). Metabolic syndrome in youth: chimera or useful concept? *Current diabetes reports*, 13(1), 56-62.
- Martos-Moreno, G., Kopchick, J., & Argente, J. (2003). Adipoquinas en el niño sano y afecto de obesidad. *Anales de pediatría*, 78(3), 189-e1.
- Mineducación. (2009). *LEY_1355_2009*. Bogotá: Ministerio de Educación .
- MinSalud. (2016). *Resolución No. 2165 de 2016*. Bogotá: Ministerio de la Salud y Protección Social.
- MinSalud. (2018). *Encuesta Nacional de la Situación Nutricional ENSIN 2015*. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social.
- Morales Clavijo, M., & Carvajal Garcés, C. (2010). Obesidad y resistencia a la leptina. *Gaceta médica boliviana*, 33(1), 63-68.
- Moreno, M. (2012). Definición y clasificación de la obesidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(2), 124-128.
- Ogden, C., Carroll, M., Lawman, H., Fryar, C., Kruszon-Moran, D., Kit, B., & Flegal, K. (2016). Trends in obesity prevalence among children and adolescents in the United States, 1988-1994 through 2013-2014. *Jama*, 315(21), 2292-2299.
- OMS. (2019). *Obesity and overweight*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. Recuperado el 30 de Septiembre de 2020, de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Pineda, C. (2008). Síndrome metabólico: definición, historia, criterios. *Colombia Médica*, 56(1), 96-106.
- Ramírez-Vélez, R., García-Hermoso, A., Agostinis-Sobrinho, C., Mota, J., Santos, R., Correa-Bautista, J., & Villa-González, E. (2017). Cycling to school and body composition, physical fitness, and metabolic syndrome in children and adolescents. *The Journal of pediatrics*, 188, 57-63.
- Reinehr, T., Kleber, M., & Toschke, A. (2009). Lifestyle intervention in obese children is associated with a decrease of the metabolic syndrome prevalence. *Atherosclerosis*, 207(1), 174-180.

- Silveira, L., Buonani, C., Monteiro, P., Mello Antunes, B., & Freitas Júnior, I. (2013). Metabolic syndrome: criteria for diagnosing in children and adolescents. *Endocrinol Metab Syndr*, 2(3), 118.
- Spalding, K., Arner, E., Westermark, P., Bernard, S., Buchholz, B., Bergmann, O., & Concha, H. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453(7196), 783-787.
- Speiser, P., Rudolf, M., Anhalt, H., Camacho-Hubner, C., Chiarelli, F., Eliakim, A., & Krude, H. (2005). Obesity Consensus Working Group Childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(3), 1871-87.
- Styne, D., Arslanian, S., Connor, E., Farooqi, I., Murad, M., Silverstein, J., & Yanovski, J. (2017). Pediatric Obesity-Assessment, Treatment, and Prevention: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 102(3), 709-757.
- Tanuz, A., Arnedo, C., & Alvis-Guzman, N. (2015). Determinantes socioeconómicos de la obesidad en escolares y adolescentes en Colombia: Un análisis regional. *Value in Health*, 18(7), A841-A842.
- Weiss, R., Dziura, J., Burgert, T., Tamborlane, W., Taksali, S., Yeckel, C., & Sherwin, R. (2004). Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *New England journal of medicine*, 350(23), 2362-2374.
- Weiss, R., Taksali, S., Tamborlane, W., Burgert, T., Savoye, M., & Caprio, S. (2005). Predictors of changes in glucose tolerance status in obese youth. *Diabetes care*, 28(4), 902-909.
- Wittcopp, C., & Conroy, R. (2016). Metabolic Syndrome in Children and Adolescents. *Pediatrics in review*, 37(5), 193-202.
- Wittcopp, C., & Conroy, R. (2016). Metabolic Syndrome in Children and Adolescents. *Pediatr Rev*, 37(5), 193-202.
- Zabarsky, G., Beek, C., Hagman, E., Pierpont, B., Caprio, S., & Weiss, R. (2018). Impact of severe obesity on cardiovascular risk factors in youth. *The Journal of pediatrics*, 192, 105-114.
- Zamrazilova, H., Weiss, R., Hainer, V., & Aldhoon-Hainerová, I. (2016). Cardiometabolic health in obese adolescents is related to length of obesity exposure: a pilot study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(8), 3088-3095.

Determinación de parámetros cinéticos en la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*

Judith Elena Camacho Kurmen¹
Ana Graciela Lancheros Díaz²
Carolina Guzmán Luna³

RESUMEN

Haematococcus pluvialis Flotow (1848) (*Chlamydomonadales*, *Chlorophyceae*) es una microalga verde que acumula carotenoides, principalmente astaxantina cuando es expuesto a condiciones de estrés, asociada con una transformación morfológica de células verdes móviles en quistes no móviles de color rojo profundo. La astaxantina es un carotenoide natural de gran interés comercial en diferentes industrias, por sus diversas propiedades como pigmento y compuesto bioactivo.

H. pluvialis presenta dificultades en el cultivo, caracterizándose por su ciclo complejo de crecimiento, susceptibilidad a contaminación y preferencia por la baja temperatura, además para producir astaxantina necesita someterse a condiciones de estrés, las cuales deben ser definidas para lograr mayor productividad de este carotenoide, ya que esta microalga acumula astaxantina en mayor cantidad y calidad que otros microorganismos.

Resaltando así la importancia de conocer el comportamiento de *H. pluvialis* en condiciones de cultivo fotoautotrófico estándar y de estrés, determinando los

parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de clorofila y astaxantina, lo cual fue el propósito del presente proyecto, ya que el establecimiento de las condiciones que mejor favorezcan la acumulación de astaxantina podría ser utilizada para un escalamiento y producción industrial más rentable.

La aplicación de modelos como el de Gompertz se recomiendan para describir la cinética de crecimiento microbiano y la cinética de bioproducción con un buen rendimiento de ajuste, reconocidos por su uso generalizado y por proporcionar información cinética valiosa.

Con las curvas de crecimiento generadas en el cultivo de la microalga a condiciones estándar y bajo condiciones de estrés se estimaron las diferentes fases de crecimiento, la máxima velocidad específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}} \text{ d}^{-1}$), la máxima biomasa de microalga (células/mL), el tiempo de duplicación (Td), la productividad de biomasa (células/mL día) y del pigmento de interés ($\mu\text{g/cel. mL}$ de astaxantina). Parámetros cinéticos que se obtuvieron a través de la aplicación de modelos matemáticos como el logístico (Verhulst, 1838), el de Baranyi y Roberts (1994) y el Gompertz (1825), cuya aplicación describió la forma adecuada del crecimiento, los parámetros que lo afectan y lo caracterizan, definiendo así que los modelos Logístico y Gompertz se ajustan mucho mejor a los datos experimentales ($R^2 \sim 1$) y describen mejor el comportamiento de la microalga bajo las condiciones trabajadas, estableciendo como las más adecuadas para cultivo y producción de astaxantina el uso de medios de cultivo RM, BBM, OHM, pH 7, fotoperiodo 20 horas luz /4 horas de oscuridad, temperatura de 25°C, agitación continua, CO₂ 5% e iluminación con lámparas fluorescentes blancas 40 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ y el uso de led con irradiancia de 22512 luxes.

La aplicación de los modelos proporcionó información valiosa en el crecimiento de la microalga y la cinética de la bioproducción de astaxantina.

INTRODUCCIÓN

La astaxantina es el carotenoide más importante desde el punto de vista biotecnológico por sus características como colorante y actividades como compuesto bioactivo. Actualmente la mayor cantidad de astaxantina es producida por síntesis química y es vendida a un precio de US \$2500/kg. El alto precio y el incremento en la demanda para este compuesto, especialmente de origen natural, debido a la necesidad de conservar la salud de las personas y a la legislación sobre la necesidad de no utilizar colorantes sintéticos en las formulaciones sino reemplazarlos por colorantes naturales en las diferentes industrias, hace que sea de interés la producción astaxantina a partir de microalgas como la *H. pluvialis*, que acumula cantidades importantes (más del 4%/g de

peso seco) y de mejor calidad que las obtenidas por otras fuentes como levaduras y plantas.

La importancia de investigar los parámetros cinéticos de crecimiento y la producción de metabolitos secundarios como la astaxantina en cultivos estándar de la microalga *H. pluvialis* y bajo condiciones de estrés, como la variación de nutrientes fundamentales como el fósforo y el nitrógeno en los medios de cultivo, la irradiancia, el color de luz, la salinidad, diseño de biorreactores, distribución y color de la luz, se debe a que estas condiciones influyen en la ruta metabólica hacia la síntesis de una mayor cantidad de metabolitos secundarios como lo es el colorante astaxantina, interés de esta investigación. Lo cual hace necesario establecer las condiciones de crecimiento adecuadas que lleven a una buena producción de biomasa y posteriormente de astaxantina en *H. pluvialis*, ya que esta microalga tiene sus dificultades en el momento de cultivo y de obtener el pigmento en cantidades de interés debido a su ciclo celular complejo.

Los estudios realizados con microalgas han demostrado que la cinética de su crecimiento depende de la disponibilidad de fuentes de carbono inorgánico, nitrógeno y fósforo, intensidad de luz, fotoperiodos, color de luz, distribución de la luz, pH y temperatura, ya que para el crecimiento de las microalgas se necesita intensidad de luz constante, temperatura y mezcla homogénea porque la disponibilidad de sustratos y nutrientes determinan la tasa de acumulación de biomasa y por lo tanto en el caso del *H. pluvialis* afecta la producción de astaxantina.

El uso de los modelos cinéticos de crecimiento de microalgas como el logístico (Verhulst, 1838), Baranyi-Roberts (1994, 1995) y Gompertz (1825), reportan parámetros cinéticos útiles relacionados con la producción de biomasa, el tiempo de duplicación, consumo de nutrientes, productividad, proporcionando datos esenciales para seleccionar las condiciones adecuadas para el cultivo de la microalga *H. pluvialis* y la producción de astaxantina de alta eficiencia. Es por esto por lo que el uso de un modelo cinético es importante para poder optimizar las condiciones de cultivo de la microalga y la producción de astaxantina, lo cual es interés de este estudio.

El estudio de los parámetros cinéticos de crecimiento que regulan el funcionamiento y producción de biomasa en los cultivos de *H. pluvialis* y la producción de metabolitos secundarios como la astaxantina en cultivos estándar de la microalga y bajo factores de estrés, como la deficiencia de nutrientes, salinidad y alta irradiación, es importante para conocer cuáles son los parámetros más adecuados para la producción de biomasa en el

cultivo de esta microalga y cuáles son los directamente asociados a la obtención de astaxantina, lo cual es interés de esta investigación, por los diferentes usos en la industria como colorante y compuesto bioactivo, que tiene este carotenoide y la calidad que se obtiene del mismo a partir de *H. pluvialis*.

El crecimiento de las microalgas y su composición bioquímica se ven fuertemente afectados por condiciones ambientales como la disponibilidad de nutrientes, fuentes de carbono inorgánico, intensidad de luz, fotoperiodos, color de luz, distribución de la luz, pH y temperatura. Por lo tanto, el uso de los modelos matemáticos que tienen la capacidad de determinar parámetros cinéticos importantes para valorar el comportamiento de los cultivos de la microalga en diferentes condiciones de crecimiento ayudará a optimizar el rendimiento de los procesos, las condiciones de funcionamiento y los sistemas de cultivo, para seleccionar las condiciones adecuadas de cultivo de la microalga *H. pluvialis* y de producción de astaxantina de manera eficiente.

Las curvas de crecimiento generadas en el cultivo de la microalga a condiciones estándar y bajo factores de estrés permitirán estimar los parámetros cinéticos de crecimiento, usando modelos matemáticos como el logístico (Verhulst, 1838), el de Baranyi y Roberts (1994) y el Gompertz (1825), los cuales proporcionan valores cuantitativos para comprender diferentes aspectos de la fisiología y del crecimiento de las microalgas, como las diferentes fases y su duración, la máxima velocidad específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$), la máxima biomasa de microalga en conteo celular (células/mL) o peso seco (gr), el tiempo de duplicación (Td), determinación de la concentración de proteína, determinación de clorofila ($\mu\text{mg/mL}$), medida de carbón orgánico total y los productos obtenidos ($\mu\text{g/mL}$ de astaxantina), para seleccionar el que asegure los mejores resultados y así establecer las condiciones adecuadas de crecimiento para esta microalga y de producción de astaxantina, paso fundamental para su explotación industrial.

En el aspecto fisiológico se conoce que la clorofila y los carotenoides cumplen una función importante en la maquinaria fotosintética, el manejo de la energía de excitación, la integración de la función fotosintética y la biogénesis de las membranas fotosintéticas influyendo en la regulación de otros procesos celulares en las plantas y microalgas, es por esto que el uso del monitoreo de las concentraciones de clorofila y astaxantina es necesario para control del cultivo de *H. pluvialis*, alga fotosintética, utilizando para ello un método de determinación de ambos pigmentos que sea fácil, accequible, rápido, reproducible y poco costoso.

Además, se ha observado que cuando el *H. pluvialis* es sometido a deficiencia de nutrientes y alta intensidad de luz, para inducir la acumulación de astaxantina, su división celular se disminuye o se detiene, ocurriendo en forma simultánea la degradación de clorofila, reducción de la actividad fotosintética y descomposición de la maquinaria fotosintética, aumentándose la producción de astaxantina.

El esquema de este documento es el siguiente: En la Sección 1, incluimos la base teórica del tema. En la sección 2 se incluye la metodología propuesta. En la sección 3.1 se presenta el cálculo de los parámetros cinéticos de los trabajos realizados por el grupo de Bioprocesos y control utilizando diferentes condiciones teniendo en cuenta los modelos aplicados como el modelo logístico, modelo gompertz y modelo Baranyi-Roberts. Se incluyen las curvas de los modelos aplicados y los parámetros cinéticos como velocidad máxima de crecimiento y tiempo de duplicación. En la Sección 3.2 se introducen la productividad de la astaxantina obtenida correlacionándolo con las condiciones de cultivo utilizadas en cada estudio.

En la última sección, se discutió cómo las curvas de los modelos logístico, Gompertz y Baranyi y Roberts se ajustan al crecimiento de *H. pluvialis* teniendo en cuenta el coeficiente de correlación (R^2 cercano a 1). Al final se incluye la conclusión.

MICROALGA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

Entre las microalgas comercialmente importantes, *H. pluvialis* es la fuente más rica de astaxantina natural que se considera como "súper antioxidante". La astaxantina natural producida por *H. pluvialis* tiene una capacidad antioxidante significativamente mayor que la sintética. La astaxantina tiene importantes aplicaciones en las industrias de nutraceuticos, cosméticos, alimentos y acuicultura.

El *Haematococcus* suministra una fuente natural de betacaroteno, luteína, vitamina E, y otros antioxidantes que proporcionan beneficios más efectivos y respuestas beneficiosas que las formas sintéticas. Algunos de estos beneficios nosotros los derivamos de miembros de estas especies en formas medicinales incluyendo la protección contra rayos UV, incremento en la fuerza del sistema inmune, y en el tratamiento de enfermedades como Alzheimer y Parkinson. (Shah et al., 2016; Ariza et al., 2023)

El *H. pluvialis* es una especie de agua dulce de la división *Chlorophyta* de la familia *Haematococcaceae* (ver tabla No 1). Esta especie es bien conocida por su alto contenido de antioxidantes fuertes como la astaxantina, que es importante en la producción de varios productos farmacéuticos y cosméticos. (Ariza et al., 2023)

Condiciones de crecimiento para *H. pluvialis*

Las microalgas han desarrollado diversos mecanismos para sensibilizarse y aclimatarse a cambios en su ambiente. Respuestas de aclimatación observadas incluyen la alteración de la síntesis y degradación complejo luz-cultivo en respuesta a cambios en la calidad e intensidad de la luz.

a. Luz

Efectos de la luz en la composición bioquímica del alga fotosintética son controlados por un proceso llamado fotoaclimatación o fotoadaptación. En este proceso las células sufren cambios dinámicos en su composición con alteraciones en las propiedades ultraestructurales, biofísicas y fisiológicas para aumentar la fotosíntesis y crecimiento del alga. Una respuesta común a la disminución en la intensidad de luz es el incremento de la clorofila *a* y otros pigmentos antena (tales como clorofila *b*, clorofila *c*, ficobiliproteínas y carotenoides primarios). En respuesta a la alta intensidad de luz la clorofila *a* y otros pigmentos involucrados en la fotosíntesis disminuyen, mientras los carotenoides secundarios (zeaxantina, β -caroteno, astaxantina) se incrementan, los cuales sirven como agentes fotoprotectores (Shah et al., 2016).

Estos carotenoides a menudo se acumulan en estructuras especiales tales como plastoglobulos de plastidos o cuerpos lipídicos citoplasmáticos, jugando roles en prevenir el exceso de la energía lumínica del alcance de la maquinaria fotosintética (Shah et al., 2016) (Richmond, 2017).

TEMPERATURA

Una óptima temperatura para el crecimiento de la microalga es cuando la célula tiene el mínimo tamaño celular y el mínimo contenido celular de carbono y nitrógeno, mientras en una temperatura baja o alta del nivel óptimo quizás se incremente el volumen celular y el contenido bioquímico, lo cual quiere decir que se necesita más carbono y nutrientes para producir una célula a la misma rata de crecimiento a una temperatura no óptima (Shah et al., 2016) (Richmond, 2017).

FACTORES NUTRICIONALES

NITRÓGENO

El nitrógeno se encuentra generalmente alrededor del 7 – 10% de la célula por peso seco, es un constituyente esencial de todas las proteínas funcional y estructuralmente en las células del alga. En general, la microalga tiene una limitada habilidad para producir materiales almacenados de nitrógeno cuando crece bajo condiciones suficientes de nitrógeno. Cuando la microalga está creciendo bajo condiciones limitadas de nitrógeno, el efecto más golpeado es la degradación específica y activa de ficobilisomas (Shah et al., 2016) (Richmond, 2017).

FÓSFORO

El fósforo es otro macronutriente que juega un importante rol en el proceso metabólico celular por la formación de algunos componentes estructurales y funcionales requeridos para el crecimiento normal y desarrollo de la microalga. Los ortofosfatos son incorporados como componentes orgánicos a través de la fosforilación. El fosfato inorgánico se presenta en las células en forma de polifosfatos, acumulándose en gránulos. Estos gránulos de polifosfato a menudo aparecen en crecimiento celular normal bajo suficiente fosfato, pero desaparece en deficiencia de fosfato (Shah et al., 2016) (Richmond, 2017).

HIERRO

El hierro juega un rol importante en la composición bioquímica celular por sus propiedades redox y su implicación en procesos fundamentales como la fotosíntesis, respiración, fijación de nitrógeno y síntesis de ADN. La deficiencia de hierro puede inducir varios cambios bioquímicos (Richmond, 2017).

SALINIDAD

Algunas microalgas son capaces de acumular moléculas pequeñas de sustancias osmoreguladoras (osmotocantes) en respuesta a un incremento en la salinidad o presión osmótica del ambiente. Cantidades de osmotocantes encontrados en microalgas son polioles. Los más comunes polioles son: glicerol, manitol, galactitol, sorbitol, sucrosa, tehalosa y glicerol galactosidasa (Richmond, 2017).

MODELOS MATEMÁTICOS

El modelado matemático es una herramienta empleada para describir la respuesta celular de las células microalgas a los cambios en los insumos de nutrientes y otros factores ambientales. Actualmente, no existe un modelo preciso que incorpore simultáneamente entradas multiparamétricas como carbono, nitrógeno, fósforo e intensidad lumínica como parámetros definitorios para la vida útil de las microalgas. (Tijani et al., 2018)

Los investigadores han aplicado diferentes modelos lineales o no lineales para describir las curvas de crecimiento y para simplificar los datos medidos para factores estresantes. Una variedad de modelos de regresión no lineales como Gompertz (1825), Richards, Stannard, Schnute y logístico se han propuesto para describir la curva de crecimiento microbiana (Çelekli et al.,2008). Todos los modelos predicen la relación entre variables ambientales y tasa de crecimiento.

Los modelos predictivos de crecimiento se utilizan para describir el crecimiento, sobrevivencia o muerte de diferentes microorganismos en función de sus principales factores de crecimiento. Los modelos predictivos utilizados permiten interpolar puntos de datos experimentales ayudando a predecir respuestas a condiciones no estudiadas. (Garre Pérez et al.,2016)

Existen varios modelos predictivos, los cuales se pueden clasificar según su complejidad en primarios, secundarios o terciarios. (Garre Pérez et al.,2016)

MODELOS PRIMARIOS

Estudian las respuestas de los microorganismos en función del tiempo. En este tipo de modelo se pueden cuantificar las células/ mL, unidades formadoras de colonia (UFC), formación de toxinas o niveles de substrato denominadas como medidas directas a la respuesta, así mismo se estudian medidas indirectas como la turbidez generada en el medio de cultivo, absorbancia, o conductancia. Dentro de estos modelos se encuentran el modelo de logístico, Gompertz (1833), y Baranyi y Roberts (1994) (Garre et al.,2016, Mazumdar et al.,2019; Ortiz Moreno et al., 2020)

El modelo logístico, el modelo de Gompertz (1825), y el modelo Baranyi-Roberts (1994) (Figura 1, Tabla 1) son algunos de los modelos con mayor frecuencia de uso en crecimiento de microalgas como para debido a factores biológicos específicos,

incluyendo el tiempo de retraso (λ), la tasa de crecimiento particular (μ) y el valor asintótico (A). (Mohd et al., 2020).

El modelo logístico (Figura 1b) no representa explícitamente las interacciones entre un organismo y su entorno interno o externo; sino indica que el crecimiento depende únicamente de la población, sin embargo, el crecimiento se ve afectado por las condiciones ambientales. (Shoener et al 2019). Este modelo se ha aplicado en evaluación de crecimiento de la microalga *H. pluvialis* (Mazundar et al., 2019), *Botryococcus braunii* (Hanief et al., 2020) y de la microalga *Nostoc ellipsosporum* (Ortiz-Moreno et al., 2020).

Tabla 1. Modelos de crecimiento con las ecuaciones y listas de parámetros

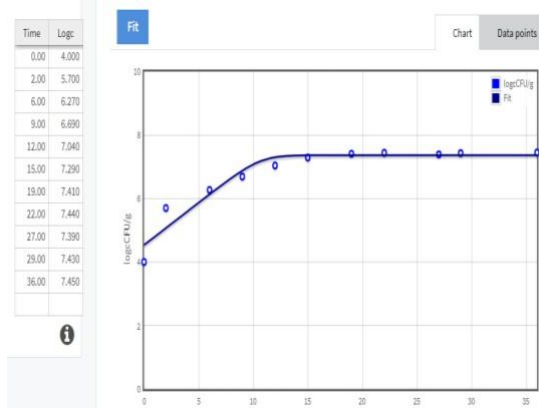
Modelo	Ecuación	Parámetros	Bibliografía
Logístico	$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)$	μ = velocidad específica de crecimiento (d^{-1})	Verhulst, 1838
Gompertz	$y = A \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{\max} e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$	μ_{\max} = velocidad máxima de crecimiento (d^{-1}) X = concentración de biomasa (Células/mL)	Garre et al., 2016
Baranyi-Roberts	$y(t) = y_0 + \mu_{\max} t + \ln \left(\frac{e^{-\mu_{\max} t} + e^{-h_0} - e^{-\mu_{\max} t - h_0}}{e^{\mu_{\max} t} + \ln \left(\frac{e^{-\mu_{\max} t} + e^{-h_0} - e^{-\mu_{\max} t - h_0}}{e^{\mu_{\max} t} - 1} \right) - 1} \right)$	X_{\max} = máxima concentración de biomasa (Células/mL) λ = tiempo fase lag $y(t) = \ln x(t)$, donde $x(t)$: densidad celular al momento t A = asíntota de crecimiento inferior $h_0 = \mu_{\max} \lambda$	Baranyi y Roberts, 1994

Los parámetros del modelo de Baranyi-Roberts (1994) son más mecanicistas y tiene un significado biológico debido a la presencia de los cuatro parámetros (A, Y_{\max} , μ_{\max} , h_0) en lugar de tres parámetros (A, μ_{\max} , λ) presentes en el modelo de Gompertz (1825), modificado y en el modelo logístico. El parámetro h_0 en el modelo de Baranyi-Roberts (1994) fue identificado como el indicador de la adaptación de la población de microorganismos al medio real. La estandarización del procedimiento experimental permitiría que el indicador de adaptación alcance el valor constante, creando una fase lag inversamente proporcional y μ_{\max} supuestas (Mohd et al, 2020).

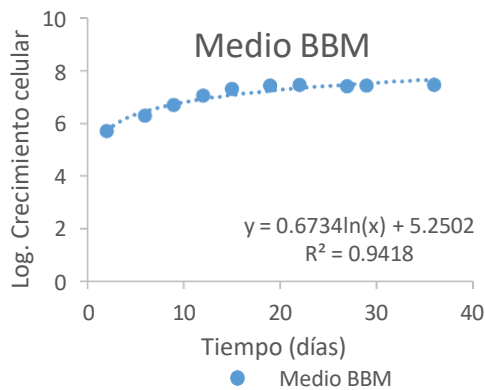
El modelo de Baranyi-Roberts (1994) (Figura 1a) se derivó por primera vez como un predictor dinámico del crecimiento de patógenos alimentarios, pero ha encontrado cada vez más capacidad predictiva aplicada en un alcance mucho más amplio, y según los estudios filológicos hicieron uso del modelo para la estimación del crecimiento de microalgas (Mohamed et al, 2013) y este modelo es muy útil en el presente estudio, porque sus parámetros tienen una interpretación biológica directa, que se puede aplicar a condiciones ambientales dinámicas y se puede ajustar a los datos experimentales, como lo reporta Ortiz Moreno et al., (2020) en el estudio de la microalga *Nostoc ellipsosporum*.

Figura 1. Curva de crecimiento *H. pluvialis* en medio BBM a. Modelo Baranyi-Roberts (1994); b. Modelo logístico (Verhulst,1838); c. Modelo Gompertz (1825)

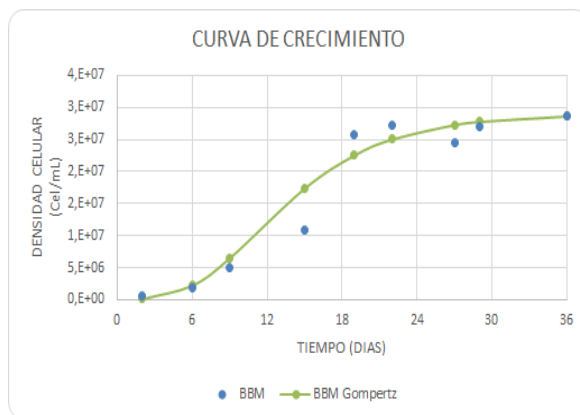
a. Modelo Baranyi- Roberts $R^2: 0.910$



b. Modelo logístico



- c. Modelo Gompertz : $R^2 : 0,952$, $\mu_{\text{m\acute{a}x}}: 0,216/\text{d\acute{a}a}$ y $t_d: 3,20$ h (Pineda y Quevedo, 2021)



El modelo Gompertz (1825), asume que la velocidad del crecimiento microbiano es una curva exponencial (Figura 1c). El modelo permite encontrar una velocidad máxima de producción de células y un tiempo de fase lag, como se ve en la ecuación Ver Tabla 1. El modelo de Gompertz, propuesto inicialmente para las tasas de mortalidad humana, ha encontrado diversas aplicaciones en el análisis del crecimiento en el campo de la biotecnología. La versión modificada con Zwietering ha demostrado ser una herramienta versátil para calcular el tiempo de retraso y la tasa / cantidad máxima de crecimiento en el crecimiento microbiano. Además, se han resumido y discutido exhaustivamente las aplicaciones actuales del modelo de Gompertz a la cinética de crecimiento microbiano y la cinética de bioproducción (por ejemplo, producción de hidrógeno, metano, caproato, butanol y hexanol). (Wang y Guo, 2024). Este modelo se ha aplicado en evaluación de crecimiento de la microalga *Botryococcus braunii* (Hanief et al., 2020) y de la microalga *Nostoc elliposporum* (Ortiz-Moreno et al., 2020).

PARÁMETROS CINÉTICOS

El crecimiento celular y la evaluación de parámetros cinéticos para monitorear el crecimiento celular se puede realizar diariamente mediante la medición de la concentración celular por triplicado, determinada por la densidad óptica del cultivo, utilizando una longitud de onda de 670 nm en un espectrofotómetro, por conteo celular (células/mL) o por peso seco de biomasa (gr). (De Mendonça et al., 2018)

La concentración celular se obtiene a través de una curva estándar sobre peso seco y densidad óptica (X máxima). Con estos datos, la productividad máxima (P máxima) se calcula con la tasa de crecimiento específica máxima ($\mu_{\text{máx}}$) y el tiempo de generación (tg). La productividad (P , g.L./d) se calcula según la ecuación, donde X (g/L) representa la concentración celular final, X_0 (g/L) representa la concentración de inicial cultivo de biomasa, t (d) representa el tiempo final y t_0 representa el tiempo inicial de cultivo:

$$P = (X - X_0) / (t - t_0) \quad (1)$$

La máxima velocidad de crecimiento (rata de crecimiento) ($\mu_{\text{máx}}$) se obtiene por regresión exponencial en la fase exponencial (fase log), donde se multiplican las células y el tiempo de generación se obtiene de la siguiente ecuación:

$$tg = \ln 2 / \mu_{\text{máx}} \quad (2)$$

Como complemento al monitoreo se mide cada 24 horas el pH del cultivo. (De Mendonça et al., 2018)

Fijación de CO₂

La acumulación de CO₂ se determina según la ecuación:

$$FA = (X_t - X_0) m_{\text{cbm}} V \text{ biorreactor} (M_{\text{CO}_2} / M_{\text{C}}) \quad ,$$

donde:

X_t (g/L) es la concentración celular en el tiempo t (d), X_0 (g/L) es la concentración a tiempo t_0 , m_{cbm} (gc/gamostra) es el peso de la fracción de carbono determinada en la biomasa microalgal, V biorreactor es el volumen de medio del bioreactor. M_{CO_2} (g/mol) y M_{C} es la masa molecular de CO₂ y de carbono. (De Mendonça et al., 2018).

METODOLOGÍA PROPUESTA

MICROORGANISMO

Haematococcus pluvialis UTEX2505, cepa de referencia (colección de cultivos de algas, Universidad de Texas, Austin TX, USA). La cepa se mantiene en medio sólido y líquido Volvox-MES (sugerido por la UTEX), a baja irradianza y temperatura ambiente (15-20°C).

SISTEMA DE CULTIVO

Realización de cultivo de *H. pluvialis* en reactores pequeños en sistema batch, por triplicado para cada medio a ensayar y en biorreactores de 5 L. (Biostat y Tecferm).

CONDICIONES DE CULTIVO

(1) Condiciones estándar:

- Cada medio estéril con el pH ajustado se adicionó en erlenmeyers de 500 mL hasta un volumen de 400 mL. Se sellaron para garantizar esterilidad. Se utilizó también el Biorreactor de 5 Litros (Biostat y Tecferm), usando los medios BBM, RM, OHM y KM.
- Se procedió a adicionar el inóculo de la microalga (1×10^4 Cél./ml).
- Se realizó el montaje de cada medio por triplicado en forma aleatoria, bajo las siguientes condiciones: pH 6,7, ciclo luz/oscuridad 20h:4h, temperatura 25°C, agitación continua, CO₂ 5% en aire, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips).
- Toma de muestra cada dos días en forma aséptica.
- Conservación de las muestras en solución formosalina (1:9), en una proporción 1:1, se toman 500 µL y se realiza control del cultivo (conteo celular y ver morfología) y el resto de muestra se utiliza para medición de pH. El conteo celular se realiza en cámara de Neubauer.
- Se llevó control de Temperatura, agitación, CO₂ en aire, ciclo luz/oscuridad, medios.

(2) Condiciones de estrés: deficiencia de nitrógeno en un 4 % y 5% de la concentración de nitrógeno presente en el medio original, deficiencia de fosfatos 10%, fosfatos 30mg/L, acetato de sodio, cloruro de sodio, luces led de colores, alta irradiancia.

GENERACIÓN DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO

Se construirán curvas de crecimiento a partir de al menos tres ensayos independientes. Se tomará una muestra diaria para la determinación del número de células por mL por microscopia.

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA

Se determinó la producción de la concentración de astaxantina, por técnica colorimétrica (Método APHA, 2005).

Determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de pigmentos

Mediante el ajuste de modelos adecuados como Baranyi- Roberts (1994) usando Dmfit, Modelo logístico (Verhulst, 1838) y modelo Gompertz (1825), usando log X vs tiempo. (ver Tabla 1)

Diseño experimental y análisis de datos

Cada experimento se repitió tres veces con al menos tres replicaciones. Se utilizó el coeficiente de correlación (R^2) para validar los modelos aplicados.

1. Resultados

PARÁMETROS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO DE LA MICROALGA *H. PLUVIALIS*

Se presentan los resultados de 13 trabajos realizados por el Grupo Bioprocesos y Control sobre los parámetros cinéticos determinados para las condiciones trabajadas usando los medios de cultivo RM, BBM y OHM, incluyendo el modelo matemático realizado, la velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{máx.}}$), el tiempo de duplicación (td) y el coeficiente de correlación (R^2) que indica como se ajustan al modelo matemático aplicado según el coeficiente de correlación con un valor de 1.

Tabla 1. Parámetros cinéticos del cultivo de *H. pluviialis* bajo diferentes condiciones obtenidos en la aplicación de modelos matemáticos.

Modelo	Medio de cultivo	N° de Datos	Dato mínimo	Dato máximo	Velocidad de	Coeficiente de	Tiempo de duplicación (td)	Bibliografía
---------------	-------------------------	--------------------	--------------------	--------------------	---------------------	-----------------------	-----------------------------------	---------------------

					Crecimiento (μ máx.)	Determinación (R ²)		
Logístico	RM	13	4	5,878	0,092	0,97	7,53	Nino et al., 2017
	OHM	13	4	5,535	0,062	0,99	11,18	
	BBM	13	4	5,588	0,056	0,97	12,38	
Gompertz	RM	13	4	5,878	0,092	0,96	7,53	
Logístico	RM	5	4	4,509	0.0329	0,99	21,06	Cueru et al., 2019
	BBM	5	4	4,580	0.0326	0,98	21,26	
Gompertz	BBM						5,19	Rios y Castañeda, 2016
	N4%	7	4	1120000	0,1334	0,92		
Logístico	RM1	10	4	6,222	0,041	0,73	16,90	Rodríguez, 2020
	RM2	10	4	5,975	0,317	0,62	2,19	
	RM3	10	4	5,986	0,292	0,48	2,37	
	RM4	10	4	5,853	0,009	0,35	7,7	
	RM5	10	4	6,368	0,285	0,73	2,43	
Baranyi- Roberts	RM2 Medio RM con fosfatos de 30 mg/L,	11	4.0	5.97	0.315	0.90	2,2	
Baranyi- Roberts	RM	10	4	6,684	0,292	0,87	2,37	Gómez et al., 2019
	RM N 4%	13	4	6,571	0,240	0,93	2,89	
	RM N 5%	13	4	6,559	0,248	0,90	2,79	
Baranyi- Roberts	Medio RM con nitrógeno al 5%, Biostat A plus	5	4.0	5.5	0.0321	0.07		Pérez y Ayala, 2019
Modelo Gompertz					0,1885		3,68 h	
Modelo logístico					0,242	0,997	2,86	
Baranyi- Roberts	Medio BBM	11	4.0	7.45	0.267	0.91	3,20	Manrique y Marín, 2019
Modelo Gompertz	Biostat 5L.				0,216	0,952*	3,20	

Modelo logístico					0,673	0,942	1,03	
Baranyi-Roberts	Medio RM con				0.29	0.869		Barreto y Ortiz, 2020
Modelo Gompertz	fosfatos al 10%, nitratos al 5%,.	14	4.0	9.94	0,392	0,896*	1,77 h	
Modelo logístico	Biostat A plus				1,19	0,94	0,58	
Baranyi-Roberts	Medio RM con	6	4.0	4.3	-0.0602	0.775	11,51	García, 2018.
Gompertz	0,299 mg/L de acetato de sodio, biorreactor TEC-FERM de 5 litros	6	4,0	4.3	-0,0394	0,993	17,6	
Baranyi-Roberts	Medio RM	6	4.0	5.1	0.0536	0.89	13	Leitón, 2018.
Gompertz	biorreactor TEC-FERM de 5 litros	6	4	5.09	0,0924	0,999	7,5	
Baranyi-Roberts	Medio OHM,	5	4.0	6.09	0.77	0.984	0,9	Hernández, 2019.
Gompertz	biorreactor TEC-FERM de 5 litros	5	4.0	6.09	0.0426	0,993	16	
Gompertz	Medio RM con acetato de sodio 1,6 g/L y Cloruro	7	4	4.62	0,0133	0,992	52	Rodríguez, 2019

	de sodio 6,4 g/L							
--	---------------------	--	--	--	--	--	--	--

RM2: 20 mg/L de fosfatos, RM3: 30 mg/L de fosfatos, RM4: 40 mg/L de fosfatos, RM5: 20 mg/L de fosfatos con 5% de nitrógeno. RMN4%: deficiencia de 4% de nitrógeno, RMN5%: deficiencia de nitrógeno al 5%

En la tabla 1 podemos observar que los parámetros cinéticos determinados para los trabajos realizados por el grupo Bioprocesos y control utilizando diferentes condiciones con medios de cultivo RM, BBM y OHM, que se obtuvieron al aplicar los modelos matemáticos logístico (Verhulst, 1838), Gompertz (1825) y Baranyi-Roberts (1994), indicaron que el modelo que más se ajusta para explicar el crecimiento de la microalga bajo las condiciones de cultivo es el modelo logístico (Verhulst, 1838), porque el coeficiente de correlación (R^2) obtenido en los trabajos donde aplicó se aproxima más a 1, usando los medios de cultivo RM y BBM. Con valores de 0,99 usando medio OHM (Hernández, 2019) y RM (Niño et al., 2017). El coeficiente de determinación indica si el modelo está bien adaptado a los datos del experimento y puede considerarse suficiente para describir la producción de biomasa por la microalga en el medio. ((Mohd et al., 2020).

Los valores de tiempo de duplicación más bajos con valores de 2, 19 días obtenido con el modelo logístico (Verhulst, 1838) y de 2,2 días obtenido con la aplicación del Modelo Baranyi-Roberts (1994), para el estudio donde se utilizó medio RM suplementado con 20 mg/L de fosfatos bajo las condiciones de pH de 6.8, fotoperiodo de 20h luz y 4h oscuridad e irradiancia de 75 luxes en fase de estrés, lámparas fluorescentes blancas Tlt 20 w/54RS marca Phillips, temperatura de 20 ± 1 °C. agitación diaria 10 segundos (Rodríguez, 2020).

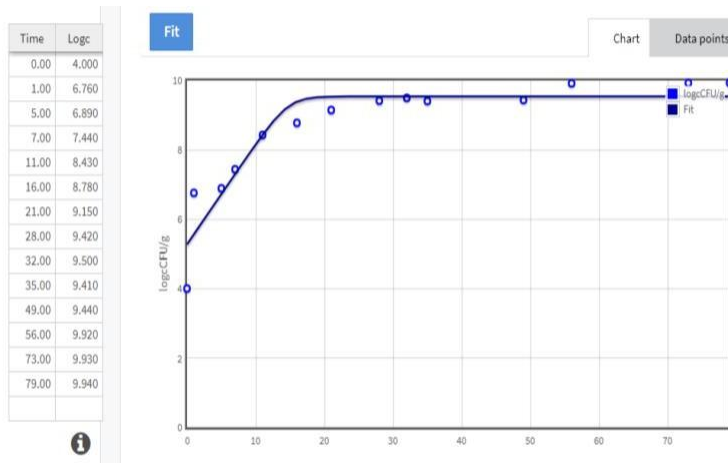
Los tiempos de duplicación más altos se reportaron para el trabajo realizado bajo las condiciones donde se usan los medios Rudic's medium (RM) y Bold's basal medium (BBM), suplementados con concentraciones de acetato de sodio de 0.248 mg/mL, 0.310 mg/mL, 0.372 mg/mL, luz blanca y azul con una irradiancia de $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con CO_2 al 5%, agitación con burbujeo, temperatura $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo 20:4 Luz / Oscuridad y pH 6.8. de las células, con valores de 21,06 días para medio RM y 21.26 días para medio BBM. (Cueru et al., 2019)

A continuación se presenta las curvas de crecimiento *H. pluvialis* en medio RM (Figura 2) obtenidas en el Modelo Baranyi-Roberts (1994), Modelo Gompertz (1825) y Modelo Logístico (Verhulst, 1838).

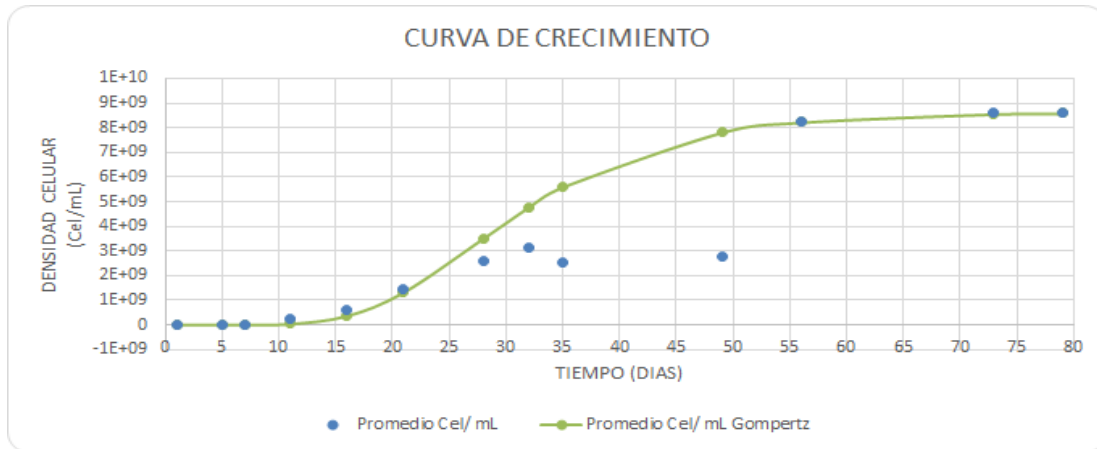
Modelo Baranyi-Roberts (1994)

Condiciones del cultivo: medio de cultivo y condiciones	N° Datos	Dato Mínimo	Dato Máximo	Velocidad de crecimiento Cel/día	Coefficiente de determinación (R ²)
Medio RM con fosfatos al 10%, nitratos al 5%, pH 6,8, e irradiancia de 280 luxes con el uso de LED de colores azul, rojo y blanco combinadas con lámparas fluorescentes en biorreactor Biostat A Plus de 5 Litros. (Barreto y Ortiz, 2020)	14	4.0	9.94	0.29	0.869

Figura 2. Curva de crecimiento *H. pluvialis* en medio RM a. Modelo Baranyi-Roberts (1994); b. Modelo Gompertz (1825); c. Modelo Logístico (Verhulst,1838)

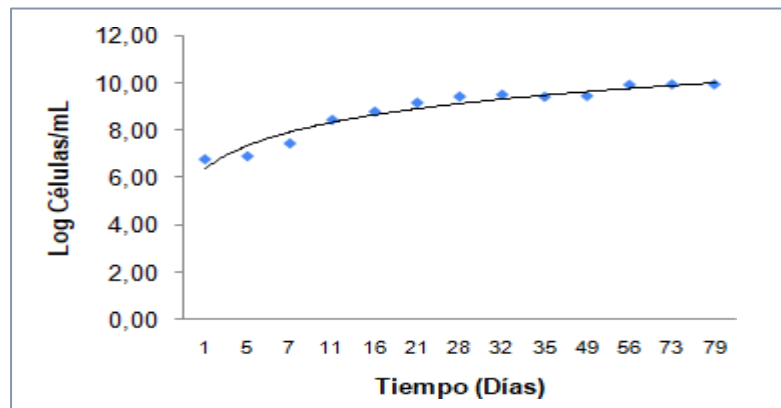


a. Curva de crecimiento Modelo Baranyi-Roberts



b. Curva de crecimiento Modelo Gompertz

R^2 : 0,896, $\mu_{\text{máx}}$: 0,392/día y t_d : 1,77 h (Pineda y Quevedo, 2021)



c. Curva de crecimiento Modelo logístico

Medio de cultivo	No. Datos	Dato mínimo	Dato máximo	Velocidad de crecimiento (células/día)	Coefficiente de correlación
RM	13	6,35	9,94	1,19	0,94

La velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{máx.}}$), según el modelo logístico es 0,092 por día para el tratamiento donde se usó medio RM con las condiciones de cultivo: pH 6.7 a 7.0, CO₂ al 5%, fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad, irradiancia 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (Niño et al., 2017).

Cuando se utilizó fosfatos en diferentes concentraciones, se incrementó la velocidad de crecimiento observándose que el tratamiento con mayor valor en este parámetro es en el que se utilizó medio RM suplementado con 20 mg/L de fosfatos (RM2) bajo las condiciones de pH de 6.8, fotoperiodo de 20h luz y 4h oscuridad e irradiancia de 75 luxes en fase de estrés, luz blanca, temperatura de 20 ± 1 °C. agitación diaria 10 segundos (Rodríguez, 2020), con un valor de 0,317/día ($R^2: 0,62$). según modelo logístico (Verhulst, 1838) y de 0,315/día ($R^2: 0,90$), según modelo Baranyi-Roberts (1994).

Según lo observado el medio BBM utilizando el biorreactor Biostat A Plus de 5 L., fue en el que se presentó una velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{máx.}}$) mayor con un valor de 0,673/día.

PRODUCTIVIDAD DE ASTAXANTINA

La deficiencia de nitrógeno es una condición de estrés que favorece una mayor producción de astaxantina. Se han usado otras condiciones que también contribuyen a la acumulación de este ketocarotenoide en los trabajos realizados, lo cual se reporta a continuación:

Tabla 2. Productividad de astaxantina y clorofila en *H. pluvialis*

Condiciones de estrés y de cultivo estándar	Concentración de astaxantina	Productividad de astaxantina (Xp/Xx)	Bibliografía
Medios de cultivo (BBM, OHM, RM). Aumento en la irradiancia a 140 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y adición de acetato de sodio de 0,310g durante 16 días	Medio RM con una concentración de 8.3 $\mu\text{g/mL}$	1,10 x 10 ⁻⁵ $\mu\text{g/cel.mL}$	Niño et al., 2017
medio RM con nitrógeno al 4.0% y una irradiancia alta de 140 $\mu\text{E/m}^2\text{s}$	La producción de astaxantina fue de 3,52x10 ⁻⁶ $\mu\text{g/cel. mL}$ con una concentración de nitrógeno al 4.0% y una irradiancia alta de 140 $\mu\text{E/m}^2\text{s}$, incrementándose en un 40% frente a la obtenida con nitrógeno al 5.0% de 2,08x10 ⁻⁶ $\mu\text{g/cel x mL}$. Los genes <i>psy</i> , <i>pds</i> , <i>lcy</i> , <i>bkt</i> y <i>chy</i> , se expresaron con nitrógeno al 4.0%, mientras con nitrógeno al 5.0% solo se expresaron <i>psy</i> , <i>pds</i> y <i>chy</i> .	3,52x10 ⁻⁶ $\mu\text{g/cel. mL}$	Gómez et al., 2019

<p>Medio Basal Bold (BBM) con deficiencia de Nitrógeno, en una concentración de 4% fotoperiodo 20/4 luz/oscuridad con lámparas fluorescentes blancas Tlt 20 w/54RS marca Phillips, Irradiancia 75 luxes temperatura 21°C, humedad relativa de 45% y agitación manual una vez al día durante 10 segundos.</p>	<p>La mayor producción de astaxantina se obtuvo en el método 1 con BBM con deficiencia de Nitrógeno al 4% con una concentración de 0,102 ug/ml a 3,058 ug/mL.</p>	<p>3,55x10⁻⁶ µg/cel. mL</p>	<p>Ríos y Vargas, 2016</p>
<p>Medios Rudic's medium (RM) y Bold's basal medium (BBM), suplementados con concentraciones de acetato de sodio de 0.248 mg/mL, 0.310 mg/mL, 0.372 mg/mL, luz blanca y azul con una irradiancia de 150 µE m⁻² s⁻¹, con CO₂ al 5%, agitación con burbujeo, temperatura 20°C ± 2°C, fotoperiodo 20:4 Luz / Oscuridad y pH 6.8.</p>	<p>Se obtuvo una mayor concentración de astaxantina en el medio RM 5.06µg/mL significativamente más eficiente para la producción (F=52.74; P=<0.0001;GL=1), en el cual se utilizó una concentración a 0.372 mg/mL de acetato de sodio, luz azul e irradiancia 150 µE m⁻² s⁻¹ como factores de estrés.</p>	<p>3.26x10⁻⁵ µg/cel. mL</p>	<p>Cueru et al., 2019</p>
<p>Biorreactores de 500mL con 350mL de medio y 1x10⁴cel/ml de inóculo en fase exponencial, las condiciones de cultivo empleadas fueron: pH 6.7 a 7.0 CO₂ al 5%, fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad, irradiancia 70 µE/m²s con variación del color de luz y un segundo tratamiento con variación del color de luz y nitrógeno al 4.0%, cada fase se desarrolló en un periodo de 30 días, de</p>	<p>El tratamiento óptimo para mejorar la producción del pigmento fue con luz roja en el medio BBM, alcanzando una producción de 7.24 x10⁻⁵ µg/cel. mL de astaxantina</p>	<p>7.24 x10⁻⁵ µg/cel. mL</p>	<p>Ávila et al., 2019</p>

los cuales 15 días fueron de crecimiento y 15 días de estrés (luz roja, luz azul) ; se llevó a cabo en los medios RM y BBM			
Medio RM bajo un pH de 6,8, temperatura 20±2°C, aire filtrado, iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad, irradiancia 70 μE m ⁻² s ⁻¹ con diferentes concentraciones de 1,6 g/L de acetato de sodio y 6,4 g/L de cloruro de sodio adicionadas a diferentes tiempos, durante 56 días.	El tratamiento al cual se le adicionó 1,6 g/L de acetato de sodio y 6,4 g/L de cloruro de sodio presentó la mayor producción astaxantina en un 20% superando los demás tratamientos con 7,3 μg/mL	1.73 x 10 ⁻⁴ μg/cel. mL	Rodríguez, 2019
Medio RM y una concentración de fosfatos de: 20 mg/L, 30 mg/L y 40 mg/L, además de un medio con 20 mg/L de fosfatos con 5% de nitrógeno y un medio control. Se utilizó un pH de 6.8, fotoperiodo de 20h luz y 4h oscuridad e irradiancia de 75 luxes en fase de estrés, luz blanca, temperatura de 20 ±1 °C. agitación diaria 10 segundos.	El tratamiento RM2 (30 mg/L de fosfatos) obtuvo mayor concentración de astaxantina con 5.772 μg/mL	6.12 x 10 ⁻⁶ μg/cel. mL	Rodríguez, 2020
Medio RM con nitrógeno al 5%, fotoperiodo de 20:4, pH de 5,7 a 6,3 y agitación constante en un biorreactor Biostat A plus	1.1 ug/mL	3,45 x 10 ⁻⁶ μg/cel. mL	Pérez y Ayala, 2019
Medio BBM pH 6,8; T°: 20 +2°C; fotoperiodo 18:6, luz blanca, azul y roja con LEDS; irradiancia 180 hasta 210 lux; aire filtrado a una velocidad de 1,7 L/min y agitación 100 rpm.	3.1 μg/mL	1,08 x 10 ⁻⁷ μg/cel. mL	Manrique y Marín, 2019
Medio RM con fosfatos al 10%, nitratos al 5%, pH 6,8, temperatura 20°C, agitación 100 rpm; velocidad de aire 1,7 L/min; aire filtrado estéril; luz blanca, fotoperiodo 20h luz y 4h de oscuridad, e irradiancia de 280 luxes con el uso de LED de colores azul, rojo y blanco combinadas con lámparas fluorescentes.	2.5 ug/mL	2,9 x 10 ⁻¹⁰ μg/cel. mL	Barreto y Ortiz, 2020
Medio RM con 0,299 mg/L de acetato de sodio, pH de 6.7, fotoperiodos 20:4, luz blanca, temperatura 25 ± 2° C, aire filtrado y agitación a 100 rpm en un biorreactor TEC-FERM de 5 litros	1.9 μg/mL	5.67 x 10 ⁻⁵ μg/cel. mL	García, 2018

Medio OHM, fotoperiodo 18:6 luz/oscuridad, luz blanca por medio de lámparas fluorescentes (Phillips master TL5 HO de 54W/827) con irradianza de 65 lux, pH 6.8, agitación 100 rpm, aire filtrado a una velocidad de 0,1 vvm y temperatura 20° C ± 2 por un periodo de 21 días de cultivo	8.21 ug/mL	6.67 x 10 ⁻⁶ µg/cel. mL	Hernández, 2019
Biomasa obtenida en el Biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 litros, sometándose a las condiciones de estrés acetato de sodio 0,375 mg/L y una irradiancia de 360 lux con LEDS blanca en cajas de cultivo celular	6.088 ug/mL	2,02 x 10 ⁻⁸ µg/cel. mL	Torres y Ubaque, 2021.
Biomasa obtenida en el Biorreactor BIOSTAT A PLUS de 5 litros, sometándose a las condiciones de estrés acetato de sodio 0,375 mg/L y una irradiancia de 360-lux con LEDS blanca, en medio RM con def. de fosfatos y de nitratos y sales en cajas de cultivo celular	5,178 ug/mL	6,11 x 10 ⁻⁵ µg/cel. mL	Ubaque, 2021

Se puede observar en la tabla 2 que las condiciones de estrés utilizadas permitieron obtener astaxantina con una productividad entre 1.73 x10⁻⁴ µg/cel. mL y 2.9 x10⁻¹⁰ µg/cel. mL. Las condiciones de estrés revisadas con las cuales se obtuvo la mayor productividad de astaxantina (1.73 x10⁻⁴ (0,000173) µg/cel. mL), son el uso de medio RM, pH de 6,8, temperatura 20±2°C, aire filtrado, iluminación con lámparas blancas fluorescentes, fotoperiodo 20h luz/4h oscuridad, irradiancia 70 µE/m²s, 1,6 g/L de acetato de sodio y 6,4 g/L de cloruro de sodio, 56 días de cultivo (Rodríguez, 2019). Seguido por las condiciones donde se usó luz roja, medio BBM, pH 6.7 a 7.0 CO₂ al 5%, fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad, irradiancia 140 µE/m²s, 30 días de cultivo con una producción de 7.24 x10⁻⁵ (0.0000724) µg/cel. mL de astaxantina (Ávila et al., 2019).

El trabajo donde se obtuvo la menor productividad de astaxantina utilizó las condiciones de estrés medio RM con fosfatos al 10%, nitratos al 5%, pH 6,8, temperatura 20°C, agitación 100 rpm; velocidad de aire 1,7 L/min; aire filtrado estéril; luz blanca, fotoperiodo 20h luz y 4h de oscuridad, e irradiancia de 280 luxes con el uso de LED de colores azul, rojo y blanco combinadas con lámparas fluorescentes en el Biorreactor Biostat A Plus de 5 L con un valor de 2,9 x 10⁻¹⁰ µg/cel. mL (Barreto y Ortiz, 2020)

DISCUSIÓN

Los modelos matemáticos son herramientas ampliamente utilizadas para determinar el comportamiento de un sistema. En la industria de la microbiología, el modelado matemático se emplea para estimar las tendencias de crecimiento celular mediante el cálculo de la tasa de crecimiento máxima especificada, la fase de adaptación (lag) y la concentración celular máxima (Mohd et al., 2020). En este trabajo se ilustra el ajuste de la curva de los modelos logístico (1838), Gompertz (1825), y Baranyi-Roberts (1994) sometida a diferentes condiciones estándar de crecimiento y de estrés encontrándose los estados de optimización de *H. pluvialis* para las condiciones.

Al aplicar el modelo de Baranyi y Roberts (1994), usando el programa DMFit (Cabeza, 2006), se obtuvo una mayor velocidad de crecimiento 0.77 /día y un coeficiente de correlación de 0.984, siendo el estudio que más se ajustó a este modelo donde se usó el Biorreactor de 5 litros Tecferm, medio OHM, fotoperiodo 18:6 luz/oscuridad, luz blanca por medio de lámparas fluorescentes con irradiancia de 65 lux, pH 6.8, agitación 100 rpm, aire filtrado a una velocidad de 0,1 vvm y temperatura $20^{\circ} \text{C} \pm 2$ (Hernández, 2019).

De acuerdo con bibliografía, el Medio Óptimo de *Haematococcus* (OHM) puede ayudar a incrementar la biomasa del cultivo inclusive 3 veces más que el medio BBM, ya que no solo posee los nutrientes requeridos para el crecimiento y metabolismo de la microalga, sino que además contiene vitaminas como biotina, tiamina y vitamina B12. Este medio no tiene algunos elementos como vanadio, yodo, boro y zinc, puesto que se ha demostrado que no son esenciales para el desarrollo de *H. pluvialis*; sin embargo, medios como el RM y BBM si contienen macronutrientes como el zinc. De igual forma cabe recalcar que el medio OHM contiene mayor cantidad de nitrógeno en forma de KNO_3 , con una concentración de 410 mg/L, superando la contenida en los demás medios.

Como se sabe, el nitrógeno es esencial en todas las proteínas funcionales y estructurales de las microalgas, además de que representa entre el 7 - 10% del peso seco celular en las mismas. Por lo tanto, si existe una limitación de la concentración de nitrógeno en el medio, *H. pluvialis* va a generar la degradación de los ficobilisomas (compuestos ubicados en la membrana tilacoidal que sirven para la captación de luz), lo que causa que la fotosíntesis continúe, pero a una velocidad reducida (Richmond, 2017). Es por

esta razón, por la que probablemente este estudio obtuvo una mayor velocidad de crecimiento del cultivo.

Al aplicar el modelo Gompertz (1825), se determinó que para lograr una mayor biomasa y mejor producción de astaxantina se deben implementar condiciones de estrés como pH 6.8, temperatura 20°C, fotoperiodo 20:4h luz/oscuridad, luz blanca, irradiancia de 70 -140 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ deficiencia de nitratos de 5% y fosfatos de 10%, agitación 100 rpm, adición de acetato de sodio(1,6g/L) y NaCl (1,28 g/L) y aire filtrado, en medio de cultivo RM, condiciones en las cuales se obtuvo la mayor biomasa de la microalga $8,62 \times 10^9$ cel./mL (Barreto y Ortiz, 2020), velocidad de crecimiento 0,39/día, un tiempo de duplicación de 1,77 días y mayor cantidad de astaxantina (7,3 $\mu\text{g/mL}$) (Rodríguez,2020). El modelo se validó utilizando R^2 : 0,9 y 0,99 cercanos a 1, indicando que este se ajustó a los datos experimentales (Pineda y Quevedo, 2021).

Las tendencias de crecimiento fueron ajustadas también al modelo logístico calculando el logaritmo en base 10 para obtener log vs t del crecimiento celular. El medio de cultivo con la mayor velocidad específica de crecimiento fue RM con las condiciones de cultivo: pH 6.7 a 7.0, CO₂ al 5%, fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad, irradiancia 70 $\mu\text{E/m}^2\text{s}$, con una velocidad específica de crecimiento de 0,092/día el coeficiente de correlación (R^2) obtenido en los trabajos donde aplicó, presentaron valores de 0,99 usando medio OHM (Niño et al., 2017) y RM (Cueru et al., 2019). Los tiempos de duplicación más altos se reportaron para el uso de los medios RM y BBM, con acetato de sodio.

El uso de fosfatos incrementó la velocidad de crecimiento observándose un mayor valor usando medio RM con 20 mg/L de fosfatos, pH de 6.8, fotoperiodo de 20h luz y 4h oscuridad e irradiancia de 75 luxes, luz blanca, temperatura de 20 ± 1 °C. agitación diaria 10 segundos (Rodríguez,2020), con un valor de velocidad de crecimiento de 0,317/día (R^2 : 0,62). según modelo logístico y de 0,315/día (R^2 :0,90), según modelo Baranyi-Roberts (1994).

Se encontró que el análisis del modelo Baranyi-Roberts (1994) era menos consistente con los resultados experimentales. Los modelos de Logístico y Gompertz estaban en línea con los datos reales, como se observa en los valores de los coeficientes de correlacion ($R^2 \sim 1$).

El modelo Gompertz (1825), presenta una curva de crecimiento exponencial con una fase de adaptación (fase lag) definida (Figura 1 y Figura 2), encontrándose una velocidad máxima de producción de células y un tiempo de fase lag, como se ha observado para

el crecimiento de la microalga en los medios RM y BBM usando biorreactor Tecferm de 5 L., con valores de R^2 de 0,993 a 0,999. Este modelo se ha aplicado al crecimiento de la microalga *Botryococcus braunii* (Hanief et al., 2020) y de la microalga *Nostoc elliposporum* (Ortiz-Moreno et al., 2020).

El modelo logístico indica que el crecimiento aplicado al *H. pluviialis* bajo las condiciones trabajadas además de depender de la población inicial, su crecimiento se ve afectado por las condiciones ambientales y de estrés, como es el uso de biorreactores Biostat A plus de 5 L con un $R^2 = 0,947$ a $0,997$, como lo ha reportado Shoener et al 2019; Mazundar et al., 2019; Hanief et al., 2020; Ortiz-Moreno et al., 2020, quienes lo han utilizado evaluando diferentes condiciones en el crecimiento de microalgas.

CONCLUSIONES

El estudio del crecimiento de *H. pluviialis* bajo diferentes condiciones de cultivo y de estrés comparando tres modelos usados para describir el crecimiento de la microalga como son el modelo logístico, Gompertz y Baranyi y Roberts (1994), utilizan la máxima velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$), describen la forma adecuada del crecimiento, los parámetros que lo afectan y lo caracterizan, definiendo así que los modelos se ajustan al comportamiento de la microalga, estableciendo las condiciones adecuadas de crecimiento y de obtención del pigmento en mayor cantidad, y poder proyectarlo hacia condiciones de producción a nivel industrial. Los modelos Logístico y Gompertz se ajustan mucho mejor a los datos experimentales ($R^2 \sim 1$).

Los parámetros cinéticos utilizados para el monitoreo del cultivo de la microalga *H. pluviialis* que llevan a una buena producción de astaxantina son biomásas iniciales de la microalga entre 1×10^4 cél. /mL hasta valores de 10^9 cél. /mL, con velocidad de crecimiento entre 0.029 /día hasta 0.6727 /día y tiempo de duplicación entre 0.67 hasta 0.99. La concentración de astaxantina se encontró con valores entre 2.5 hasta 354 mg/L y La productividad de astaxantina se encontró entre 1.73×10^{-4} $\mu\text{g}/\text{cel. mL}$ y 2.9×10^{-10} $\mu\text{g}/\text{cel. mL}$, presentándose la mayor productividad de este carotenoide con el uso de medio RM, 1,6 g/L de acetato de sodio y 6,4 g/L de cloruro de sodio.

REFERENCIAS

Ariza Hernández, V., Garzón Pulido, M. C., & Camacho Kurmen, J. E. (2023). Revisión del estado actual de las formulaciones y aplicaciones de astaxantina producida por *Haematococcus pluviialis*.

- APHA. American Public Health Association (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC. Stand Methods Exam Water Waste Water. 2005;
- Ávila Quintero, K. R., Rico Norato, E. D., & Rivero Torres, C. A. (2019). Efecto del estrés producido por la variación del color de luz y la deficiencia de nitrógeno, sobre la expresión de genes y producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis*.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International journal of food microbiology*, 23(3-4), 277-294.
- Barreto, P.A. y Ortiz, T. (2020). Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo los factores de estrés deficiencia de fosfatos, deficiencia de nitratos y alta irradiancia utilizando el biorreactor BIOSTAT A PLUS 5 L.
- Cabeza, EA. (2006). DMFit web edition. Universidad de Pamplona
- Çelekli, A., Balcı, M., & Bozkurt, H. (2008). Modelling of *Scenedesmus obliquus*; function of nutrients with modified Gompertz model. *Bioresource technology*, 99(18), 8742-8747.
- Cuero Amú, K. J., Domínguez Castillo, J. A., Espitia Sánchez, K. D., & Fuentes Cañón, L. A. (2019). Efecto de los factores de estrés acetato de sodio, alta irradiancia y color de luz sobre la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*.
- De Mendonça, H. V., Ometto, J. P. H. B., Otenio, M. H., Marques, I. P. R., & Dos Reis, A. J. D. (2018). Microalgae-mediated bioremediation and valorization of cattle wastewater previously digested in a hybrid anaerobic reactor using a photobioreactor: comparison between batch and continuous operation. *Science of the Total Environment*, 633, 1-11.
- García Martín, L. 2018. Producción biotecnológica de Astaxantina a partir *Haematococcus pluvialis* en biorreactor Tec-ferm de 5 litros.
- Garre Pérez, A., Egea Larrosa, J. A., & Fernández Escámez, P. S. (2016). Modelos matemáticos para la descripción del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos.

- Gómez, L., Orozco, M. I., Quiroga, C., Díaz, J. C., Huérfano, J., Díaz, L. E., ... & Camacho, J. E. (2019). Producción de Astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia. *Revista Mutis*, 9(2), 7-24.
- Gompertz, B. (1825). XXIV. On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. In a letter to Francis Baily, Esq. FRS &c. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, (115), 513-583.
- Hanief, S., Prasakti, L., Pradana, Y. S., Cahyono, R. B., & Budiman, A. (2020, November). Growth kinetic of *Botryococcus braunii* microalgae using Logistic and Gompertz Models. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2296, No. 1). AIP Publishing.
- Hernández Cortes, Á. M. (2019). Producción de biomasa de la microalga *Haematococcus pluvialis* utilizando los medios de cultivo ohm y kobayashi en el biorreactor tecferm de 5 litros.
- Leiton Arcos, Y. A. (2018). Producción de *Haematococcus pluvialis* en un biorreactor tecferm de 5 l en medios de cultivo RM y BBM.
- Manrique Pinzón, M. A., & Marín Corredor, D. L. (2019). Evaluación del efecto de la deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia como factor de estrés para la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* por medio de cultivos realizados en el biorreactor biostat® a plus.
- Mazumdar, N., Novis, P. M., Visnovsky, G., & Gostomski, P. (2019). Effect of culturing parameters on the vegetative growth of *Haematococcus alpinus* (strain lcr-cc-261f) and modeling of its growth kinetics. *Journal of phycology*, 55(5), 1071-1081.
- Mohamed, M. S., Tan, J. S., Kadkhodaei, S., Mohamad, R., Mokhtar, M. N., & Ariff, A. B. (2014). Kinetics and modeling of microalga *Tetraselmis* sp. FTC 209 growth with respect to its adaptation toward different trophic conditions. *Biochemical engineering journal*, 88, 30-41.
- Mohd, N., Yasin, N. H. M., & Takriff, M. S. (2021, February). Predictive growth model of indigenous green microalgae (*Scenedesmus* sp. UKM9) in palm oil mill

effluent (POME). In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 1051, No. 1, p. 012070). IOP Publishing.

- Niño-Castillo, C. M., Rodríguez-Rivera, F. C., Díaz, L. E., & Lancheros-Díaz, A. G. (2017). Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *Nova*, 15(28), 19-31.
- Ortiz-Moreno, M. L., Cárdenas-Poblador, J., Agredo, J., & Solarte-Murillo, L. V. (2020). Modeling the effects of light wavelength on the growth of *Nostoc ellipsosporum*. *Universitas Scientiarum*, 25(1), 113-148.
- Perez Zambrano, E. T., & Ayala Agudelo, Y. (2019). Producción de clorofila y astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis* bajo estrés inducido por deficiencia de nitrógeno en el biorreactor Biostat Aplus de 5 litros.
- Pineda Amaya, V. D., & Quevedo Guerrero, M. D. (2021). Aplicación de un modelo primario y determinación de condiciones óptimas en el crecimiento de *Haematococcus Pluvialis* y producción de Astaxantina.
- Ubaque, J.L., Camacho J.E. (2021). Producción de astaxantina usando acetato de sodio, alta irradiancia y la biomasa de *Haematococcus pluvialis* obtenida del Biorreactor BIOSSTAT A PLUS.
- Ríos SL y Vargas ME.(2016). Producción de astaxantina y ácidos grasos bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta luminosidad en *Haematococcus pluvialis* usando medio BBM.
- Richmond, A. (2017). Microalgae of economic potential. In *Handbook of Microalgal Mass Culture* (1986) (pp. 199-244). CRC press.
- Rodríguez Romero, L. J. (2019). Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo efecto de factores de estrés como acetato de sodio y cloruro de sodio.
- Rodríguez N. (2020). Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo el efecto de la deficiencia de fosfatos y alta intensidad de luz.
- Shah, M. M. R., Liang, Y., Cheng, J. J., & Daroch, M. (2016). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Frontiers in plant science*, 7, 531.

- Shoener, B. D., Schramm, S. M., Béline, F., Bernard, O., Martínez, C., Plósz, B. G.,... & Guest, J. S. (2019). Microalgae and cyanobacteria modeling in water resource recovery facilities: A critical review. *Water research X*, 2, 100024.
- Tijani, H., Yuzir, A., Dagang, W. R. Z. W., Zamyadi, A., & Abdullah, N. (2018). Multi-parametric modelling and kinetic sensitivity of microalgal cells. *Algal research*, 32, 259-269.
- Torres Cadavid, L., & Ubaque Ramírez, J. L. (2021). Producción de Astaxantina usando las condiciones de estrés acetato de sodio y alta intensidad de luz utilizando la biomasa de la microalga *Haematococcus pluviialis* obtenida en el biorreactor Biostat a plus de 5 L.
- Verhulst, P.F., 1838. Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. *Correspondance mathématique et physique* 10, 113-121.
- Wang, J., & Guo, X. (2024). The Gompertz model and its applications in microbial growth and bioproduction kinetics: Past, present and future. *Biotechnology Advances*, 108335.

Determinación de antagonistas como alternativa de control de *Fusarium oxysporum* en cultivo de Gulupa⁶

Ligia Consuelo Sánchez Leal⁷
Martha Lucía Posada Buitrago⁸
Laura Carolina Rodríguez Cubillos⁹
Viviana Andrea Zota Zorro¹⁰
Ruth Páez Díaz¹¹

La gulupa es un fruto tropical que pertenece a la familia de las pasifloras y ha adquirido importancia debido al incremento del mercado de exportación. El mayor problema fitosanitario del cultivo, es la infección causada por *Fusarium* conocida por los agricultores como secadera y que ocasiona grandes pérdidas para la producción; una alternativa de control diferente a la química es encontrar antagonistas nativos en suelo y material vegetal de la planta. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de microorganismos nativos con potencial antagonista empleando técnicas de identificación por biología molecular en un cultivo de gulupa ubicado en Mosquera, Cundinamarca. La metodología incluyó el aislamiento de microorganismos, extracción de ADN, verificación por PCR, secuenciación, búsqueda en las bases de datos del genbank y ensayos de antagonismo. Los resultados permitieron identificar la presencia de *Kernia sp*, *Penicillium pulvillum*, *Penicillium ochrochloron*, *Pseudomonas cedrina*. Los ensayos más prometedores se evidenciaron al enfrentar el patógeno con *Bacillus spp.* y *Trichoderma intricatum* puesto que lograron mayor inhibición de crecimiento del patógeno en

⁶ Caracterización del patógeno causante de la “secadera” y posibles controladores biológicos, en cultivos de pasifloras, en fincas productivas.

⁷ Magister en Biología Universidad Militar Nueva Granada. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Docente de Planta Tiempo Completo. lconsuelosanchez@unicolmayor.edu.co

⁸ Doctorada en Microbiología Universidad Complutense de Madrid. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Docente de Planta Tiempo Completo. mlposada@unicolmayor.edu.co

⁹ Estudiante Programa de Laboratorio Clínico Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. lrodriguezucubillos@unicolmayor.edu.co

¹⁰ Estudiante Programa de Laboratorio Clínico Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. vzota@unicolmayor.edu.co

¹¹ Magister en Educación. Universidad de Santo Tomás. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Docente Ocasional Tiempo Completo. rpaezd@unicolmayor.edu.co

comparación con los otros aislamientos. A futuro, será necesario evaluar la actividad biocontroladora de los microorganismos aislados con ensayos *in vivo* controlados.

PALABRAS CLAVE: Antagonismo, Control, Gulupa, *Fusarium oxysporum*

INTRODUCCIÓN

La gulupa (*Pasiflora edulis* Sims) conocida como fruta de la pasión púrpura o maracuyá morado ICA (2009), pertenece a la familia Passifloraceae, es un fruto tropical nativo de la cordillera de los Andes. En Colombia, la producción y comercialización está adquiriendo cada vez más importancia debido al incremento de consumo y mercado de exportación Miranda et al (2009), según la Federación Colombiana de Productores de Pasifloras (Fedepasifloras) y Procolombia, la producción de este cultivo se concentra en 23 departamentos, siendo Antioquia, Boyacá, Caldas, Cauca, Cundinamarca y Huila los principales productores, los cuales alcanzaron para el año 2018, un total de 24.799 toneladas y un aumento del 2.2 % registrado al cierre del año 2019 (Agronegocios 2019).

La gulupa, al igual que las otras especies de la familia se han visto afectadas por muchos patógenos y plagas; actualmente, se han reportado alrededor de 16 enfermedades para todas las pasifloráceas, provocadas por virus, bacterias, nemátodos y en mayor proporción por hongos, todos estos con capacidad de invadir xilema, floema, afectar follaje, raíces y frutos Hoyos (2010) por ello es necesario intervenir de forma oportuna en el manejo fitosanitario del cultivo. El género *Fusarium* ha tomado gran importancia en el sector agrícola debido a las pérdidas económicas que genera para el agricultor; sus principales especies patógenas *F. oxysporum* y *F. solani*, causantes de la marchitez vascular, una enfermedad que disminuye drásticamente la producción y se caracteriza por la aparición de síntomas que inician con clorosis, evolucionan a defoliación con necrosis en tallo, síntomas que por lo general no son claramente diferenciales en una etapa temprana de la infección y que pueden ser confundidos con afectaciones de otra índole.

Al igual que muchos otros cultivos en Colombia y en el mundo, el manejo de plagas y enfermedades que se emplea es el uso de sustancias químicas y su práctica indiscriminada ha generado diversidad de problemas como el deterioro del suelo, resistencia de los microorganismos presentes y pérdida del bioma natural de la zona. En consecuencia, una de las alternativas de manejo para las enfermedades, sería la búsqueda de enemigos naturales efectivos como un elemento importante a la hora de realizar un manejo integrado, puesto que el control biológico representa una forma eficiente de contrarrestar la propagación y desarrollo del patógeno dentro de la planta.

Para mantener la salud de este cultivo, se requiere actuar de manera oportuna realizando una vigilancia y control activo de las enfermedades, para disminuir la incidencia de problemas fitosanitarios, aumentar la tolerancia de la planta al ataque, eliminar las condiciones que favorezcan su propagación y así poder obtener un producto de calidad. Por esta razón, se hace imprescindible tener en cuenta enfermedades frecuentes como la marchitez vascular que ponen en riesgo la producción ⁴. Con base en lo anterior, se plantea como objetivo principal, identificar microorganismos antagonistas del fitopatógeno *Fusarium oxysporum* como alternativa de control en el cultivo de gulupa proveniente de una finca de Mosquera, en Cundinamarca.

ANTECEDENTES

Se conocen casi 400 especies del género *Passiflora*, de los cuales alrededor de 60 son comestibles y provienen de Latinoamérica específicamente de Brasil, a mediados del siglo XIX la distribución de variedades como la gulupa se expandieron a países del continente hasta llegar a regiones de Asia, África y Australia, promovida por su uso industrial, culinario y medicinal (Ocampo, 2006). Las primeras iniciativas para el desarrollo comercial del cultivo iniciaron en los años treinta en Australia, Nueva Zelanda, Hawái y Kenia (Ocampo y Wyckhuys, 2012); sin embargo, en la mayoría de estos países, los cultivos comerciales fueron devastados por una enfermedad que causaba la marchitez en las enredaderas del cultivo, y fue así como Purgs en 1954 describe por primera vez al posible patógeno, *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae*.

Más adelante Cook, en 1975 hace observaciones referentes a la infección de plantas en el terreno y anota que el maracuyá morado o *Passiflora edulis* f. *edulis* Sims es muy susceptible a la marchitez por *Fusarium* sp, por lo que consideró dicha infección una seria amenaza para la producción. Como resultado para el 2004, se inició una búsqueda de especies resistentes capaces de mostrar tolerancia al patógeno, fue en este momento cuando *P. edulis* f.sp. *flavicarpa*, conocida como forma amarilla se convirtió en un mecanismo viable para hacer frente al marchitamiento del cultivo causado por *Fusarium oxysporum*; sin embargo, para este momento se encontró que *Fusarium solani* también producía los síntomas de clorosis seguida de necrosis, defoliación, fragmentación del tronco y separación de la corteza características propias de la enfermedad (Morton, 2004). Serrano et al (2007), investigan sobre las técnicas de control de plagas y enfermedades. Una de las alternativas de tratamiento en el sector agrícola es el control biológico, un mecanismo basado en el uso de organismos (de sus metabolitos o subproductos) capaces de contrarrestar los efectos producidos a la planta a causa de la infección por un patógeno. Destacan que es un gran reto multidisciplinar en el que distintos géneros de hongos: *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp, *Coniothyrium* sp y *Candida* sp, y bacterias de los géneros *Streptomyces*

sp, *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp y *Agrobacterium* sp, aislados del suelo o de la planta pueden tener potencial controlador frente a fitopatógenos.

Cole D, Hedges (2008) realizaron estudios sobre la marchitez del maracuyá morado causada por *Fusarium solani* y el posible papel de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* en la enfermedad, puesto que con frecuencia esta especie fue hallada en la base del tallo de plantas marchitas. De esta manera, lograron establecer que las plantas inoculadas con *F. solani* mostraban un marchitamiento progresivo, mientras que las infectadas con *F. solani* y *P. nicotianae* v. *Parasitica* murieron rápidamente; además, establecen que el maracuyá rojo *Passiflora caerulea*, podría ser considerado una porta injerto al resultar resistente a los dos patógenos.

Por su parte, Fernández et al en 2011, conscientes de que la marchitez del maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *flavicarpa*) causado por *Fusarium oxysporum* f. sp *passiflorae* afectaba en gran medida el rendimiento del cultivo, establece como forma alternativa el control biológico y logra demostrar que el crecimiento de *Trichoderma harzianum* en cultivo dual superó el crecimiento del patógeno. En este mismo año, Akila et al, también estudiaron la marchitez del plátano causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* y productos vegetales combinados con agentes de biocontrol, entre ellos *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis*, en donde comprobaron la reducción de incidencia de la enfermedad que se correlacionó con la actividad de enzimas de peroxidasas y polifenol oxidasa.

Posteriormente, Ortiz y Hoyos en 2012, logran diferenciar la infección causada por *F.oxysporum* de *F. solani* en cultivos de Gulupa en Colombia, observando los síntomas hallados en muestras recolectadas en la región del Sumapaz y pudieron observar que el material infectado con *Fusarium oxysporum* se caracterizaba por el retraso en el crecimiento, clorosis, pardeamiento de color rojizo en los haces vasculares, diferente a *Fusarium solani*, que demostró pudrición de tallo, clorosis de las ramas y cambio de color del cuello, síntomas que evolucionan a necrosis y finalmente el marchitamiento.

En relación con la fisiología de Gulupa, Flórez et al, caracterizaron la fenología del ciclo reproductivo de *Passiflora edulis* Sims y el crecimiento de su fruto, analizando los cambios que pueden tener de acuerdo con la relación de variables climáticas donde se encuentra el cultivo Flórez et al. (2012).

Lecomte et al, hacen énfasis en que *Fusarium oxysporum* es uno de los hongos más patógenos y destructivos con capacidad de afectar diversos cultivos de frutas y vegetales en diferentes fases de la producción. Como controladores encontraron especies de *Pseudomonas* sp y *Trichoderma* sp como los más efectivos los cuales podrían ser implementados como otros modelos para un manejo integral de plagas y enfermedades que junto a un manejo cultural y alternativas como aceites esenciales y barreras naturales serían una opción viable. En el 2017, en Rumania se adelantó un estudio que se centró en métodos biológicos para controlar una enfermedad

frecuente, mediante la inoculación de sustratos estériles específicos en cultivos hidropónicos, con organismos benéficos y que dio como resultado que las plantas tratadas con *Trichoderma* spp, tuvieran un aumento hasta de dos veces la biomasa foliar y un mejor desarrollo de las raíces que las plantas inoculadas con el patógeno *Fusarium oxysporum* Giurgiu y et al. (2018). Para el año 2018, Arcila y col. valoraron la cepa *Streptomyces racemochromogenus* en cultivos de gulupa como método alternativo de control para *Fusarium oxysporum*, donde se demostró que el tratamiento preventivo inoculado en la fase de preparación de suelo refleja una evolución positiva en la sanidad. No obstante, también se concluye que el costo del tratamiento no es viable para un agricultor con un cultivo extensivo, por lo que se debe seguir investigando para optimizar el tratamiento. Finalmente, Khalil M, Shimaa H publicaron a inicios del año 2020 los resultados de un experimento *in vivo* en el cual se incluyeron condiciones controladas bajo invernadero y condiciones de campo dadas por una infección natural de la zona, que dieron como resultado la efectividad de *Trichoderma harzianum* frente al control de *Fusarium oxysporum*, logrando establecer que la inoculación de *Trichoderma* sp, además de proporcionar un control, también una aumenta de actividad enzimática en la rizosfera y la calidad en el fruto, además de sugerir un posible efecto sinérgico cuando se inoculó con *Azospirillum brasiliense* como biofertilizante.

Las pasifloras forman parte de la familia Passifloraceae que cuenta con al menos unas 630 especies repartidas en 18 géneros, de los cuales el más relevante es el género *Passiflora*, debido a que puede ser usada como un fruto comestible. Algunas pueden presentar beneficios ornamentales o incluso usos medicinales. Su nombre proviene de la morfología de sus flores, pues se dice que, durante la colonización unos misioneros españoles vieron en dicha flor elementos de la Pasión de Jesucristo, y por este motivo la llamaron “Flor de la Pasión”(Miranda, 2009).

Las pasifloras crecen generalmente en lianas perennes o enredaderas con zarcillos; se cree que su extensa variación morfológica, es el resultado de las relaciones coevolutivas que ha tenido la familia con diferentes organismos protectores y hasta polinizadores. América, cuenta con aproximadamente 500 especies; en Colombia se incluyen 167 especies, de las cuales 165 son nativas y representan aproximadamente el 27% de la familia(Ocampo, 2006), en las que 42 producen fruto comestible, 3 se consideran extintas y muchas se encuentran en peligro de extinción. La siembra y la floración del cultivo de Gulupa dura aproximadamente 180 días, en la cual se consideran 10 estados fenológicos: yema floral, flor en antesis, fruto cuajado, fruto con estructuras florales persistentes que lo cubren, fruto inmaduro en crecimiento, fruto en madurez fisiológica, fruto con 30% de coloración púrpura, fruto con 50% de coloración, con 70% y finalmente 100% de coloración púrpura (Flórez et al.,2012).

Estas características hacen que la gulupa se haya posicionado como una buena alternativa económica que fortalece el sector de agrícola y a su vez ha podido ingresar a los mercados de

exportación con productos de alta calidad, disponibilidad y que cumplen con los criterios acordados en tratados como el de Libre Comercio; por ello, la importancia de conocer características del cultivo para favorecer la producción de este y además tratar de evitar plagas y enfermedades (Instituto Colombiano Agropecuario, 2017). Colombia por su variedad de climas, cuenta con varias zonas ideales para el cultivo de especies de pasifloras, pero en especial la gulupa (*Passiflora edulis* Sims.), también llamada fruta de la pasión púrpura o maracuyá morado; en los últimos años, ha tomado un gran reconocimiento y demanda en mercados nacionales y especialmente los internacionales, fomentando así el incremento de áreas de cultivo en el país.

La gulupa se cultiva entre los 1600 y los 2200 metros sobre el nivel del mar (msnm), las temperaturas bajas como lo son 15°C en el día y 10°C en la noche reducen el crecimiento vegetativo y las temperaturas mayores 30°C en el día y 25°C en la noche, pueden afectar la etapa de floración (Hoyos 2010). Con relación a los requerimientos edáficos, los suelos deben ser ricos en materia orgánica, francos o franco-arcillosos con buen drenaje, los cuales favorecen su sistema radical al contar con una óptima disponibilidad de agua (Ortiz, 2010); se requiere además baja presencia de sales y un pH entre de 6,5 y 7,5. El crecimiento, la apertura de flores y su productividad también puede estar influida por los cambios de radiación solar, ya que, un exceso puede dañar los frutos (Hoyos 2010).

La marchitez vascular es el nombre que se le otorga a una enfermedad que afecta a una gran variedad de cultivos y confiere síntomas claves para su diagnóstico, en Colombia, se le conoce como secadera; se han descrito 2 tipos de afectación, una conocida como la marchitez que inicia con retraso en el crecimiento, clorosis leve y evoluciona a necrosis, defoliación con rugosidades en frutos adheridos; la segunda genera pudrición, y se caracteriza por producir un chancro en el cuello que progresa desde la epidermis hasta la médula y logra la muerte de la planta.

El ciclo de esta enfermedad inicia cuando las esporas de resistencia (clamidosporas) empiezan a germinar en un suelo, las hifas se adhieren a las raíces y el micelio comienza a ascender por los haces vasculares específicamente por el sistema xilemático que da vía a su rápida dispersión, como mecanismo de defensa la planta genera gomas, las cuales, al igual que el patógeno, van a obstruir el sistema hidráulico de la planta y es allí cuando la sintomatología empieza a ser visible en el exterior (Ocampo, 2007). La agresividad de la enfermedad depende de varios aspectos como las características del hongo, la edad de la planta, condición ambiental que facilite la interacción del hongo y la planta, entre otros. Entre sus características morfológicas, se destaca la producción de colonias de crecimiento rápido, con micelio aéreo algodonoso que varía de blanco a tonalidades rosadas; en cuanto a su microscopía, cuenta con tres clases de esporas que orientan la especie; las primeras son las macroconidias hialinas y curvas en forma de hoz septadas, con filídes simples y cortas, las microconidias son esporas hialinas pequeñas sin septos y de forma ovalada y finalmente las clamidosporas estructura de resistencia, que se

presenta como esporas de pared gruesa. Entre las especies reportadas como patógenas, se destacan *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. verticilloides*, responsables de afectar plantas, animales y las dos primeras vinculadas a infección en humanos, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos. Dichas especies cuentan con mecanismos de acción como la liberación de enzimas degradadoras, toxinas o sustancias que logran romper barreras celulares, afectar estructuras como el protoplasma o inhibir crecimiento, sumado a que su incremento micelial interfiere y bloquea el paso de agua y nutrientes (Aguilar et al.,2012)

El manejo integrado de plagas y enfermedades incluye una gran variedad de herramientas, que incluyen métodos preventivos, mecánicos, químicos, biológicos, culturales, etiológicos entre otros. Por lo tanto, la vigilancia y control se debe monitorear desde la fase de preparación del terreno, la siembra, el riego, fertilización, las podas, el uso de semilla sometidas a controles de calidad fitosanitaria, manejo de arvenses y son los primeros pasos para asegurar el cultivo. Otra medida, son las buenas prácticas agrícolas de gran importancia en el manejo fitosanitario del cultivo junto con datos climáticos, el monitoreo y la combinación integral y equilibrada de estrategias de control biológico, químico (rotación de ingredientes activos), físico y biotecnológicas, llegan a ser el mecanismo más efectivo para mantener las poblaciones de patógenos y plagas en un umbral bajo o controlable en donde el daño a la planta o a el cultivo no sobrepase el límite (Hoyos et al.,201). Por sus características morfo - fisiológicas, las pasifloras son susceptibles a una gran variedad de plagas y enfermedades, por consiguiente, la búsqueda de estrategias disponibles para el control debe estar dirigidas a la prevención y control de incidencia de los agentes causales como mecanismo para mitigar los daños y, por tanto, es indispensable eliminar o modificar condiciones que favorezcan el desarrollo de plagas y enfermedades (Instituto Colombiano Agropecuario, 2009).

En el cultivo de gulupa las principales enfermedades: Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), Roña o costra (*Cladosporium herbarum*), Mancha parda (*Alternaria passiflorae*), Marchitamiento vascular o secadera (*Fusarium oxysporum* y *F solani*), Pudrición de la raíz y del tallo (Complejo *Fusarium solani*, *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium* sp.) Mancha aceitosa (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*). Las más relevantes por la pérdida de producción que ocasionan son la roña y la secadera debido a que afectan hasta un 80% la producción. Adicionalmente, la antracnosis y la mosca de las frutas deterioran la calidad del fruto y pierde su valor comercial. Muchas de las enfermedades pueden afectar ya sea cuello de tallo y raíces, sus flores y frutos o pueden ser enfermedades vasculares y foliares (Hoyos et al.,2010; Khalil et al.,2020). No obstante, muchos cultivos agrícolas no son destruidos en su totalidad gracias a la barrera natural capaz de controlar o reducir los efectos nocivos de un patógeno; y es así, donde el control biológico junto con un manejo integral de plagas surge como una estrategia eficaz para mitigar el impacto de plagas y enfermedades.

Para el control, los agricultores y productores han aumentado las tasas de aplicación de agentes químicos, generando resistencia a los diferentes insecticidas, herbicidas y plaguicidas provocando otros riesgos a la salud vegetal, animal y humana, por ello en compañía y dentro del manejo integrado de plagas se encuentra el control biológico, el cual es “un medio ambientalmente racional y eficaz de reducir o mitigar las plagas y los efectos de las plagas mediante el uso de enemigos naturales” según Bakera et al.(2020). Los enemigos naturales incluyen parasitoides, depredadores, nematodos, entomopatógenos, patógenos, los cuales usan mecanismos como la antibiosis, producción de enzimas líticas, parasitismo, competencia por los nutrientes y espacio e inducción de resistencia; cada una con gran importancia y regidas por las características del ambiente y el patógeno, se convierten opción para realizar el control de fitopatógenos y de gran interés para los investigadores(Altieri et al.,1982;Bakera et al.,2020). El control biológico es posible gracias a las interacciones dentro de un ecosistema, dadas por complejas redes de interacciones y clasificadas de acuerdo con el beneficio o afectación que se dé dentro de la asociación; por esta razón encontramos interacciones conflictivas, benéficas o neutrales (Ho et al.,2016).

MATERIALES Y MÉTODOS.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de suelo de cultivo de gulupa se recolectaron a una profundidad de 20 cm en 10 puntos aleatorios en un área de una fanegada, los cuales se mezclaron para obtener una muestra final de 1 kg. El material vegetal se recolectó de tallos, hojas y raíces de plantas de gulupa aparentemente sanas. En todos los casos, las muestras fueron almacenadas en bolsas ziploc y marcadas de acuerdo con el punto y su contenido, transportadas y mantenidas bajo refrigeración.

Aislamiento de microorganismos

Para las muestras de suelo, se realizaron diluciones seriadas (De 10^{-1} a 10^{-6}) en agua peptonada 0.1 % y posteriormente se colocó 50 ul en los agares Sabouraud, PDA y BHI con el fin de recuperar la mayor cantidad posible de microorganismos. En cuanto a las muestras vegetales, se realizó un lavado con Tween 80, y se colocaron cortes de tallo, hoja y raíz en los tres agares y en cámara húmeda, con el fin de favorecer el crecimiento de los hongos. Para el segundo aislamiento, se revisaron las colonias que tenían similitud morfológica y frecuencia en los diferentes agares, las cuales se aislaron en medios no selectivos para observar morfología macro y microscópica. Con este segundo aislamiento, se purificaron las siembras y se prepararon para realizar

identificación convencional por medio de, Azul de Lactofenol para hongos y levaduras, coloración de Gram y pruebas bioquímicas en tubo para Bacterias.

Pruebas de antagonismo in Vitro

El procedimiento tuvo tres réplicas en los agares Sabouraud, PDA y BHI, con el fin de evidenciar el comportamiento de cada microorganismo. De igual forma, cada microorganismo tuvo un control de crecimiento, fue sembrada cada colonia en un medio independiente para lograr establecer el diámetro de crecimiento de cada uno y así observar el crecimiento individual. Finalmente, se seleccionaron los microorganismos que presentaron antagonismo.

Identificación Molecular

La extracción del ADN genómico se realizó con el kit *Quick-DNA™ Universal* de ZYMORESEARCH® (USA), siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción de DNA. Se realizaron 2 protocolos distintos de extracción el primero para procesar muestras de bacterias y levaduras, y el segundo para muestras de hongos.

Para las bacterias, la amplificación de la región 16S por PCR se realizó utilizando los cebadores 16s-8F* 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3' y 16s-1492R* 5' ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3', siguiendo las instrucciones del fabricante y con ADN genómico de *Bacillus subtilis* como control positivo de la PCR. La PCR se llevó a cabo en un termociclador MultiGene Optimax (Labnet International, Inc., USA) y las condiciones de PCR según lo descrito por Taylor 1990.

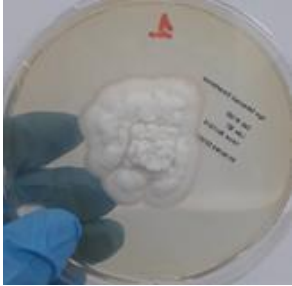
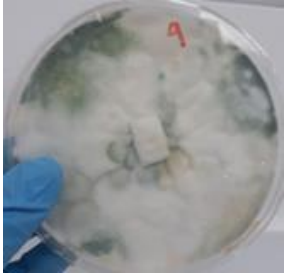
En cuanto a los hongos y levaduras, la amplificación de la región ITS por PCR se realizó utilizando los *cebadores* ITS1* 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' e ITS4* 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', sintetizados por Macrogen (USA) y la enzima *OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix with Standard Buffer* de New England Biolabs (USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó ADN genómico de *Aspergillus niger* como control positivo de la PCR. Los productos de PCR tanto de bacterias como de hongos y levaduras, se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X, teñido con Gel Green Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X (Biotium, USA), con un voltaje constante de 100V y 50 minutos de corrido. El gel se observó con el sistema de documentación Bio-Rad Chemi XRS Gel Documentation System y el Bio-Rad Quantity One® software (Bio-Rad, USA) y el marcador de peso molecular utilizado fue el Hyperladder II (50-2000pb) de Bioline (USA).

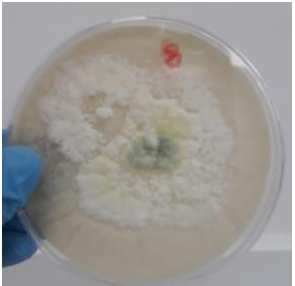
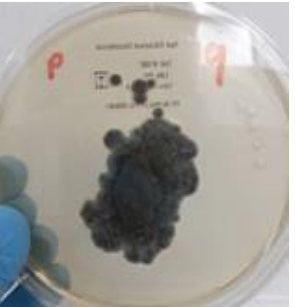

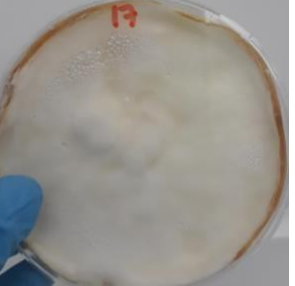


Una vez evidenciada las bandas en la electroforesis, los productos de PCR se enviaron al servicio de secuenciación de Macrogen-USA (USA). Allí fueron purificados y posteriormente secuenciados por el método Sanger. La edición de las secuencias se realizó con el programa bioinformático gratuito Chromas Lite 2.0 de Technelysium (Australia) y mediante el uso del algoritmo BLASTn (BLAST[®], National Library of Medicine, USA) se hizo la comparación de las secuencias resultantes con las bases de datos internacionales.



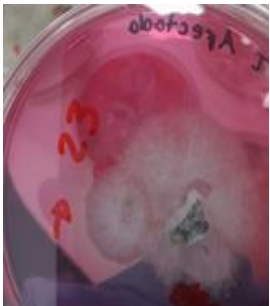



RESULTADOS



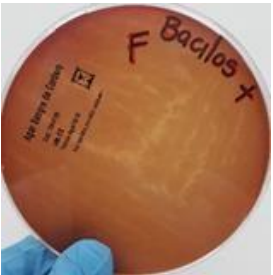

En la primera fase de aislamiento, en las 4 diluciones empleadas se observó una gran diversidad de microorganismos en las diluciones correspondientes a 10^{-3} y 10^{-4} en donde se evidenció un promedio de crecimiento de 82 y 17 colonias respectivamente, de los cuales se seleccionaron 25 colonias con base a la frecuencia y similitud de crecimiento en los diferentes agares, con el fin de iniciar la segunda fase de aislamiento y posterior purificación de cada una. Como resultado se obtuvo la selección de 4 bacterias, 4 levaduras y 10 hongos.

Tabla 1. Aislamiento de posibles microorganismos con función antagonista

AISLAMIENTO DE POSIBLES MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS			
CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN
PR1	 <p>Figura 1 PR1 Colonia aterciopelada blanca</p>	PR4	 <p>Figura 2 PR4 Colonia pulverulenta de color blanco que se torna a un verde olivo</p>



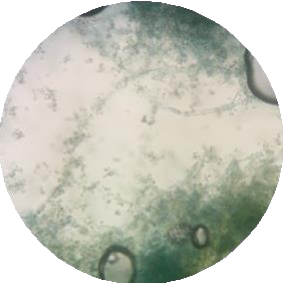
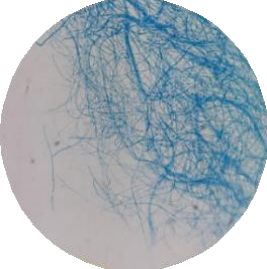
PR8	 <p data-bbox="349 604 738 682">Figura 3 PR8 Colonia pulverulenta de color blanco</p>	PR9	 <p data-bbox="998 625 1356 682">Figura 4 PR9 Colonias negras granulosa negras</p>
PR10	 <p data-bbox="349 1014 738 1081">Figura 5 PR10 Colonia algodonosa plana anaranjada</p>	PR17	 <p data-bbox="1031 1014 1323 1081">Figura 6 PR17 Colonia blanca algodonosa</p>
PR18	 <p data-bbox="349 1339 738 1402">Figura 7 PR18 Colonias blancas pequeñas cremosas</p>	PR19	 <p data-bbox="982 1360 1372 1423">Figura 8 PR19 Colonias blancas pequeñas cremosas</p>


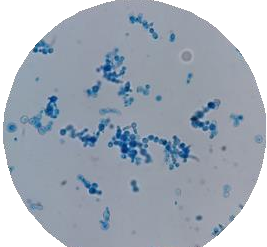
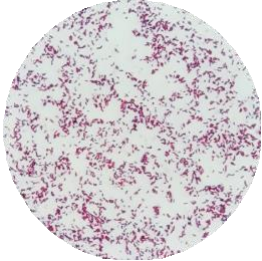
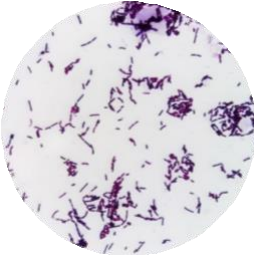
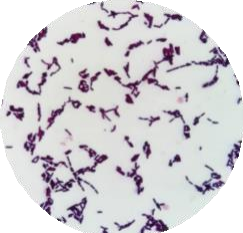
<p>PR20</p>	 <p>Figura 9 PR20 Colonias beige pequeñas cremosas</p>	<p>PR22</p>	 <p>Figura 10 PR22 Colonia algodonosa de color blanco</p>
<p>PR23</p>	 <p>Figura 11 PR23 Colonia algodonosa de color blanco</p>	<p>PARA</p>	 <p>Figura 12 PRA Colonia aterciopelada naranja con borde verde</p>
<p>PRB</p>	 <p>Figura 13 PRB Colonias blancas cremosa</p>	<p>PRC</p>	 <p>Figura 14 PRC Colonias blancas cremosa</p>

<p>PRCH</p>	 <p>Figura 1 PRCH Colonia pulverulenta de color blanco</p>	<p>PRD</p>	 <p>Figura 16 PRD Colonias pequeñas cremosas No fermentadoras – Mc Conkey</p>
<p>PRF</p>	 <p>Figura 17 PRF Colonia en forma rizoide B hemolisis- Agar Sangre</p>	<p>PRG</p>	 <p>Figura 18 PRG Colonia medianas secas B hemolisis Agar Sangre</p>

Paralelamente, se procedió a realizar azul de lactofenol para las colonias de hongos, levaduras y coloración de Gram y para las bacterias. En el caso de los hongos, no se pudieron identificar con precisión por medio de claves dicotómicas. En cuanto a las bacterias y levaduras se logró determinar su morfología. En la Tabla 2 se presenta la morfología microscópica de los microorganismos aislados.

Tabla 2. Identificación microscópica, Bacterias, hongos y levaduras

CODIGO	DESCRIPCIÓN	DESCRIPCIÓN
PR1 Azul de lactofenol		Figura 19 PR1 Azul de lactofenol Hifas delgadas hialinas, cenocíticas.
PR4 Azul de lactofenol		Figura 20 PR4 Azul de lactofenol Hifas delgadas, hialinas, ramificada con fiálides solas, esporas pequeñas agrupadas. Compatible con <i>Trichoderma sp</i>
PR8 Azul de lactofenol		Figura 21 PR8 Azul de lactofenol Hifas delgadas, hialinas, ramificada con fiálides solas, esporas pequeñas. Compatible con <i>Trichoderma sp</i>
PARA Azul de lactofenol		Figura 22 PRA Azul de lactofenol Hifas hialinas, cenocíticas.

<p>PRCH</p> <p>Azul de lactofenol</p>		<p>Figura 23 PRCH Azul de lactofenol</p> <p>Hifas hialinas anchas, septadas, ramificadas. Esporas ovaladas hialinas.</p>
<p>PRC</p> <p>Azul de lactofenol</p>		<p>Figura 24 PRC Azul de lactofenol</p> <p>Esporas circulares en gemación, compatibles con morfología de levaduras.</p>
<p>PRD</p> <p>Tinción de Gram</p>		<p>Figura 25 PRD Tinción de Gram</p> <p>Bacilos cortos, Gram negativos</p>
<p>PRF</p> <p>Tinción de Gram</p>		<p>Figura 26 PRF Tinción de Gram</p> <p>Bacilos Gram positivos</p>
<p>PRG</p> <p>Tinción de Gram</p>		<p>Figura 27 PRG Tinción de Gram</p> <p>Bacilos Gram positivos</p>

Posterior al aislamiento e identificación morfológica de las bacterias (PRD, PRF Y PRG), se realizó identificación por medio de pruebas bioquímicas en tubo. Los resultados se presentan a continuación.

Tabla 3. Actividad enzimática por pruebas bioquímicas

PRUEBAS BIOQUÍMICAS IDENTIFICACIÓN BACTERIANA				
Gram negativo	PRD	Gram positivos	PRG	PRF
TSI	K/A	TSI	A/A	K/A
LIA	k/k	Glucosa	+	+
MIO	-/-/+	Maltosa	-	+
MOT	-	Sacarosa	+	+
FeA	-	Arabinosa	+	-
CS	+	Xilosa	+	+
VP	-	Manitol	+	-
RM	+	Urea	-	-
Nitritos	+	Nitritos	+	+
Urea	+	CS	-	-
Glucosa	+	MOT	+	+
Lactosa	-	Gelatina	+	+
Sacarosa	-	Bilis es.	-	-
		Almidón	+	-

Los resultados fueron comparados con las tablas de “*Systematic bacteriology, second edition de Bergey’s*” identificando a la bacteria PRD como Bacilo Gram negativo del género *Pseudomonas* spp y los bacilos Gram positivos PRG como *Bacillus subtilis* y PRF como *Bacillus* sp.

El ensayo de antagonismo *In vitro* se realizó empleando microorganismos aislados y puros. Todos los enfrentamientos contaron con el control de crecimiento, en la tabla 10 se observan los resultados de esta fase.

Tabla 4. Pruebas de antagonismo *In vitro*





	
<p>Figura 28 Antagonismo en medio Sabouraud, PRX contra PRA y PR1</p>	<p>Figura 29 Antagonismo en medio PDA, PRX contra PRA y PR1</p>
	
<p>Figura 30 Antagonismo en medio BHI, PRX contra PRC y PRB</p>	<p>Figura 31 Antagonismo en medio PDA, PRX, PRC y PRB</p>



Figura 32 Antagonismo en medio Sab, PRX contra PRF y PRG



Figura 33 Antagonismo en medio Sab PRX contra PR4 y PR8

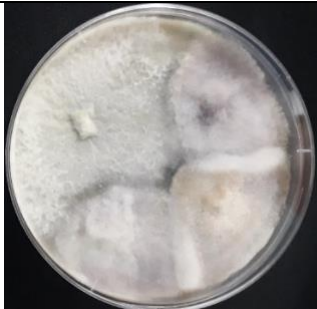


Figura 34 Antagonismo en medio PDA, PRX contra PR4 y PR8



Figura 35 Antagonismo en medio PDA, PRX contra PRD y PRG

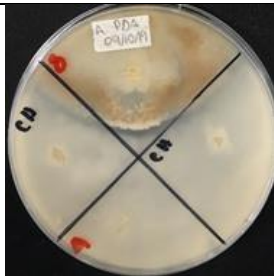


Figura 36 Antagonismo en medio PDA, microorganismo PRCH contra PR4 y PR8



Figura 37 Antagonismo en medio Sab, microorganismo PR CH contra PR4 y PR8

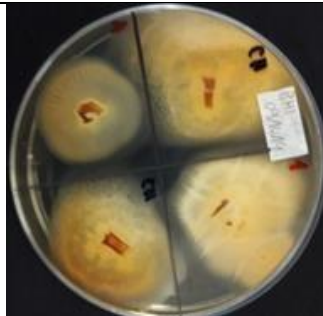


Figura 38 Antagonismo en medio BHI, microorganismo PRCH contra PRA y PRI

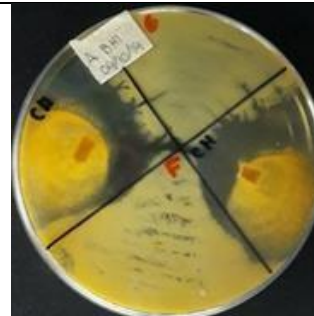
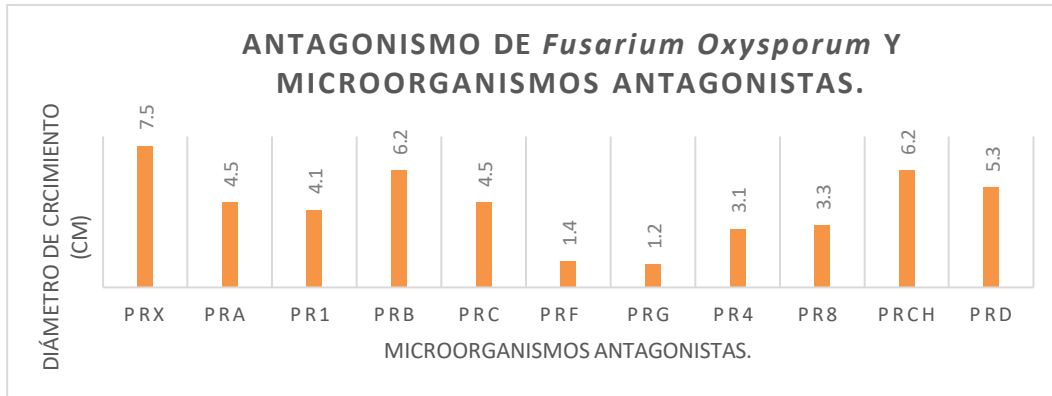


Figura 2 Antagonismo en medio BHI, microorganismo PR CH contra PR F y PR G

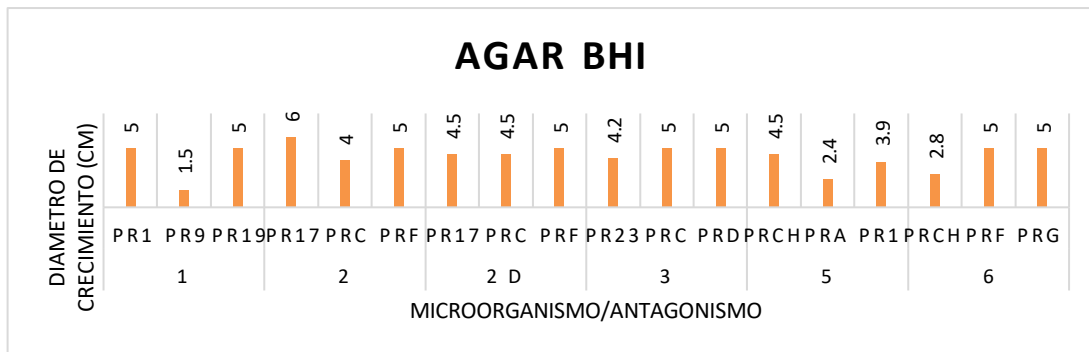
Figura 1. Antagonismo con *Fusarium oxysporum*



En el antagonismo de los microorganismos aislados frente a la cepa *Fusarium oxysporum* identificada como PRX, se evidencia un control de crecimiento de PRX de 7.5 cm y se destaca como mejores bacterias antagonistas a PRF, PRG quienes lograron la menor expresión de PRX (1,2; 1,4 cm), seguidos de los hongos antagonistas PR4 y PR8 que lograron disminuir el diámetro de crecimiento de PRX comparado con los otros aislamientos. Los microorganismos identificados PRB y PRCH demostraron reducida actividad antagonica.

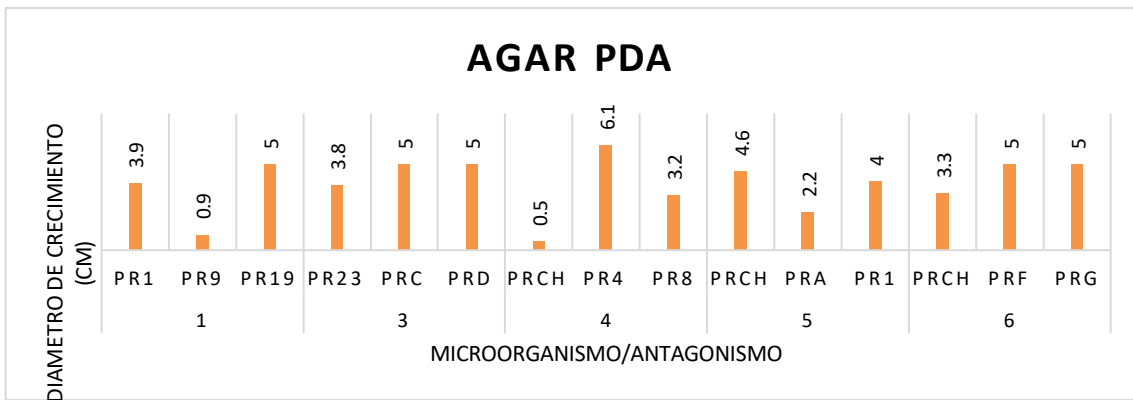
En las gráficas siguientes, se evidencia el comportamiento de los microorganismos de acuerdo con los enfrentamientos realizados y el medio de cultivo empleado.

Figura 2. Pruebas de antagonismo en agar BHI



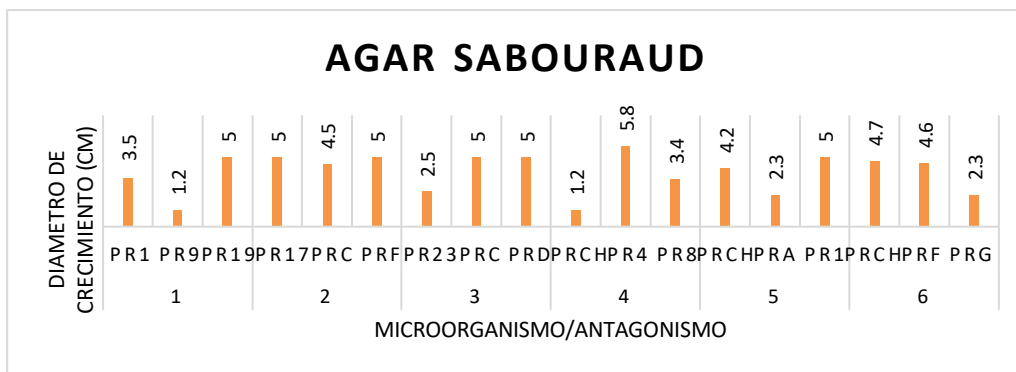
En los enfrentamientos en agar BHI representados en la gráfica anterior, se puede evidenciar la disminución de crecimiento de los hongos PR9 frente a los hongos, PR1 y PR19, y PR A, frente a PRCH y PR1, el mayor diámetro de crecimiento fue dado por el microorganismo PR17 siendo el mayor antagonista frente a PRG Y PRF.

Figura 3. Pruebas de antagonismo en agar PDA



En cuanto al agar PDA, el hongo con mejor crecimiento fue PR4 con 6.1 cm quien en este caso redujo a 0,5 cm el crecimiento de PRCH, en los enfrentamientos 3 y 6 también se puede evidenciar como las bacterias PRF, PRG, PRD y PRC obtienen un buen crecimiento sin hacer antagonismo entre ellas.

Figura 4. Pruebas de antagonismo en agar Sabouraud



En los enfrentamientos en agar Sabouraud se obtuvo buen crecimiento para la mayoría de los microorganismos, y logrando el mayor diámetro de crecimiento PR4.

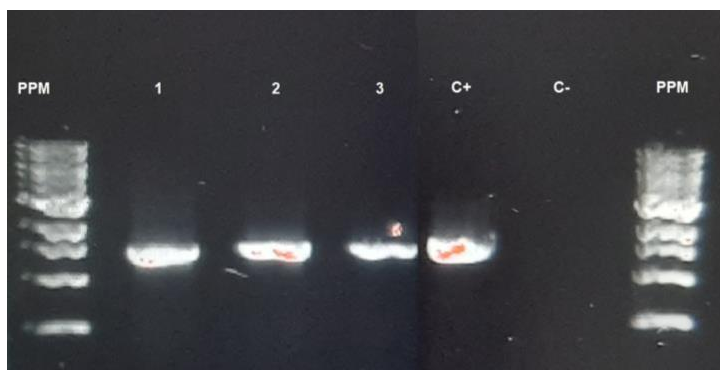
Los productos de PCR de hongos realizada con los cebadores ITS1 e ITS4 se observan claramente en la figura 82, y los productos de PCR de bacterias realizada con los cebadores 16S-8F y 16S-1492 se muestran en la figura 5.

Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa para muestras de hongos



PPM: Patrón de peso molecular, C+: Control positivo DNA *Aspergillus niger*, C- muestra sin DNA, De la banda 1 a la 7, se encuentran ubicadas PRC4, PR1, PRA, PRC, PR4, PR8, PRCH, respectivamente.

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa para muestras de bacterias



PPM: Patrón de peso molecular, C+: Control positivo DNA *Bacillus subtilis*, C- muestra sin DNA, De la banda 1 a la 3, se encuentran PRD, PRF, PRG.

SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

Tabla 5. Resultados de secuenciación y análisis de datos

N ^o	Mx	COMPARACIÓN BLAST	COBERTURA	IDENTIDAD	GEN BANK
1	PRCH	<i>Kernia</i> sp	96%	99.66%	KY931505.1
2	PR1	<i>Penicillium pulvillorum</i>	70%	93.55%	AF178526.1
3	PRA	<i>Penicillium ochrochloron</i>	49%	98.53%	MT601879.1
4	PRC	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	91%	99.81%	KF728799.1
5	PR4	<i>Trichoderma intricatum</i>	84%	95.54%	MF383141.1
6	PR8	<i>Hypocrea</i> sp	99%	99.82%	JF439479.1
7	PRD	<i>Pseudomonas cedrina</i>	99%	99.88%	KT767857.1
9	PRF	<i>Bacillus</i> sp	96%	97.79%	JN793563.1
10	PRG	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	90.70%	EF591777.1

DISCUSIÓN

Uno de los problemas fitosanitarios que más limitan el cultivo de *Passiflora edulis* f. *edulis* Sims (Gulupa), es la marchitez vascular conocida como secadera; Aguilar et al. (2012) describen que en la fase inicial de la enfermedad, se presenta deshidratación y clorosis que aumenta al avanzar

la infección afectando ramas y hojas hasta llegar a la defoliación total de la planta, la tasa de crecimiento disminuye y los frutos no alcanzan la madurez por causa de la necrosis y finalmente muere²⁴; Fischer et al.(2008), afirman que esta enfermedad es causada principalmente por *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae* y *F. solani* , dos especies de gran importancia en el sector agrícola, puesto que, son los fitopatógenos con mayor impacto económico para la agricultura; y demás cuenta con una gran variedad de plantas hospedantes. Por su parte, Garcés de Granada et al.(2001), describe que el género *Fusarium* tiene una distribución cosmopolita con la capacidad infectar diferentes plantas por medio de varios mecanismos de acción que proporciona la patogenicidad y virulencia necesaria para derrotar la actividad enzimática que actúa como defensa natural . Además, algunas de las especies llegan a ser patógenos oportunistas para el ser humano y los animales, al producir micotoxinas que interfieren gravemente en la salud (Arbeláez et al.,2000).

Por lo anterior, la búsqueda de microorganismos en suelo y en tejido vegetal, con posible capacidad antagonista se convierte en una alternativa amigable que contrarreste el uso intensivo de agroquímicos, favorezca el desarrollo óptimo del cultivo y potencie interacciones benéficas mediadas por microorganismos de suelo. Dentro de los aislamientos se destaca la diversidad de colonias de hongos encontrados en las muestras de suelo analizadas; resultados que pueden estar explicados debido a que, son los hongos los representan una gran fracción de la biomasa microbiana, y su importancia radica principalmente en la capacidad enzimática para degradar y transformar. Así mismo, muchos de los hongos filamentosos se asocian con la raíz de la planta para generar una relación simbiótica conocida como micorrizas, en las cuales se agregan una gran diversidad de microorganismos que cumplen diversas funciones; Sierra et al. (2017), indican diferencias significativas en la biomasa en plántulas de granadilla cuando hubo colonización micorrizal; y encontrando una disminución del efecto negativo del nematodo *Meloidogyne javanica* en la producción, sugiere la importancia de los hongos en la fase de vivero del cultivo de granadilla, para incrementar la biomasa, la captación de fósforo, y la tolerancia de las plántulas a los nematodos del género *Meloidogyne*³².

En cuanto a las bacterias, se evidenció crecimiento de abundante de colonias (Gram negativas y Gram positivas), resultados que indirectamente reflejan el contenido de materia orgánica, como lo indica Delgado (2006) en donde establece que, los suelos con alto contenido de materia orgánica tienden a contener más organismos, siendo la fracción del suelo asociada a las raíces de las plantas, el punto de mayor concentración. Los mecanismos de interacción han sido ampliamente estudiados para favorecer procesos de biorremediación, promover crecimiento y controlar especies patógenas; Hernández et al.(2014), empleó bacterias diazotróficas y evidenció aumento de fijación de nitrógeno atmosférico a la planta, liberación de metabolitos que disminuyen la concentración y crecimiento de *Pyricularia oryzae*; resultados que reflejan la capacidad de controlar cepas patógenas, estimular el crecimiento vegetal, disminuir los efectos perjudiciales para el cultivo e indirectamente incidir en la reducción del uso de fertilizantes químicos³⁴.

En los ensayos de antagonismo *in vitro*, se destacó la disminución de crecimiento del patógeno *Fusarium oxysporum* por acción de las bacterias PRF y PRG, identificadas por pruebas bioquímicas y de biología molecular como *Bacillus* sp. y *Bacillus subtilis*. Datos que concuerdan con los obtenidos por Jangira et al.(2018), en donde los metabolitos bioactivos de la cepa *Bacillus* sp., aislada de la rizosfera del tomate, tienen gran actividad de control del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, y que enzimas como la quitinasa y β -1, 3-glucanasa podrían tener un papel importante en la digestión de las hifas.

Así mismo, *B. subtilis* es una de las especies que más se han estudiado como agente de biocontrol; Stein destaca que los genes que expresan biosíntesis de antibióticos combinados pueden sumar aproximadamente 350 kb, haciendo énfasis que *B. subtilis* dedica cerca del 5% del genoma a la producción de antibióticos(Stein, 2005). Adicionalmente, Fire et al.(2018), señalan estudios en los que se evidencia la actividad antifúngica directa sobre hongos patógenos, particularmente del género *Fusarium* sp. , por *B. subtilis* así como también, Cucu et al.(2020) dan un acercamiento de lo que sería aplicación preventiva del microorganismo *Bacillus subtilis* con ensayos “*in situ*”, demostrando que el tratamiento indujo la reducción significativa de la enfermedad, en comparación con los testigos no tratados y evidenciando el control de 70% de la marchitez causada por *Fusarium* del tomate.

La capacidad antagonista presentada por las dos bacterias aisladas está mediada por mecanismos propios del género *Bacillus*, el cual se caracterizan por contar con una distribución mundial y la capacidad de formar endoesporas; una condición que favorece la diseminación y prevalencia en diversos ecosistemas. Su principal reservorio es el suelo, lugar donde establece interacciones con distintas comunidades microbianas presentes en la rizosfera (Villarreal et al.,2018);de acuerdo con Fira et al. (2018), las especies de *Bacillus* sp tienen la habilidad de competir por nichos ecológicos e inducir resistencia sistémica en las plantas, agregando que las cepas de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. sphaericus*, *B. mojavensis*, *B. pasteurii* y *B. pumilus* son productoras de moléculas antibióticas fuertemente inhibitorias del crecimiento de fitopatógenos³⁷. Ongena y Jacques también afirman que *Bacillus* spp. puede llegar a sintetizar más de dos docenas de compuestos antimicrobianos, agrupados en péptidos sintetizados ribosómicamente (incluidas las bacteriocinas) y péptidos sintetizados enzimáticamente por vías no ribosómicas; como los lipopéptidos, sustancias ampliamente estudiadas la surfactina, potente biosurfactante que por su naturaleza anfifílica pueden unirse en las capas de los lípidos, y dependiendo de la cantidad pueden afectar la integridad de la membrana biológica. Las iturinas han mostrado una fuerte acción antifúngica al formar poros que alteran la

permeabilidad de la membrana; finalmente las fenicinas tiene fuerte toxicidad, principalmente mente contra hongos filamentosos (Ansari et al., 2004).

Por otra parte, de los aislamientos realizados los hongos PR4 y PR8 fueron los que presentaron mejor rendimiento y mayor acción antagónica; estos microorganismos contaban con claves dicotómicas compatibles con el género *Trichoderma* sp., pero que gracias a la identificación molecular se logró identificar a *Trichoderma intricatum* (PR4) y *Hypocrea* sp.(PR8). El género *Trichoderma* spp. pertenece a la familia *Hypocreaceae*, y cuenta con 27 especies conocidas entre las cuales se destaca *T. harzianum*; en la fase perfecta (estado Telomorfo) se ubica en la división Ascomycetes, Orden Hipocreales, familia *Hypocreaceae*, género *Hypocrea*(Chaverri et al.,2015); se caracteriza por ser un hongo cosmopolita, ampliamente estudiado por su alta capacidad reproductiva, eficiencia en la utilización de nutrientes, inducción de mecanismos de defensa y fuerte actividad inhibitoria contra hongos fitopatógenos.

Sundaramoorthy y Balabaskar (2013)aislaron a *T. harzianum* y *T. viride* de rizosfera del tomate y evidenciaron su función como fuertes y virulentos antagonistas, también vieron estudios donde de igual manera eran buenos controlados de *Fusarium* spp. en otros cultivos como lo son algodón, trigo y melón. Estos autores evidenciaron el crecimiento de la planta posiblemente por la secreción de auxinas, gibelinas y citoquinas, los cuales también fueron descritos por Chaverri et al. (2015), quien indica que muchas de sus especies son el ingrediente activo de productos que tienen como fin mejorar el rendimiento y crecimiento de plantas o se encuentra disponibles para el uso en el control biológico .Como en el 2016, cuando Kouipou et al.(2016) manifiestan que en experimentos *in vitro* e *in vivo* mostraron que dos cepas *Trichoderma* spp. podría ejercer más del 86% y 27% de inhibición de crecimiento y germinación de esporas respectivamente de *Fusarium solani* .

Como se ha visto, son muchos los estudios que respaldan la eficacia *Trichoderma*, *sin embargo*; la especie *T. intricatum* no ha sido documentada, Sun, R. et al 2012 la informa por primera vez al analizar la diversidad de especies *Trichoderma* en china (Sun et al.,2012), por lo anterior es indispensable estudiar más acerca del comportamiento de nuevas especies.

El microorganismo que mostró menor capacidad antagónica fue el PRCH, identificado como *Kernia* sp, es un género de hongos del que poco se conoce, pertenece al filo Ascomycota, Subclase *Hypocreomycetidae*, orden Microascales, familia Microascaceae cuenta con 11 especies aceptadas(Su et al., 2019). Hasta el momento, solo han sido reportadas *K. bifurcotricha* y *K. nítida* como dos de las primeras especies descritas en 1916 por Nieuwland(Rana et al.,2019). Las especies de esos hongos son frecuentemente aisladas de estiércol, suelo, carne en descomposición y piel de animales, excepto *K. retardata* y *K. peruviana* aisladas únicamente en suelo (Udagawa et al., 1988). En cuanto a su morfología microscópica, se encuentran hallazgos compatibles con la descrita por Malloch en la cual especifica hifas septadas rectas, arqueadas, a veces onduladas con paredes gruesas, lisas y con ascosporas hialinas de forma elipsoidal con extremos redondeados(Malloch y Cain, 1971). De igual forma, de la familia Microascaceae se

conoce que agrupa una gran variedad especies fitopatógenas, saprófitas muchas con características intrínsecas de resistencia a algunos agentes antifúngicos(Su et al,2020). *Kernia* spp ha sido reportado en distintos países y diversos cultivos (Rana et al., 2019) como microorganismo endófito, es decir que hasta el momento su desempeño radica en vivir de manera asintomática en los tejidos de las plantas sin causar daño y, como en la mayoría de endófitos, posiblemente contar con metabolitos como flavonoides, isoflavonoides y fenólicos capaces de atraer hongos de la rizosfera para colonizar el interior de la planta(Rodríguez y Dias-Filho ,1996). La posibilidad de convertirse en patógeno, aún no se ha informado.

Entre los microorganismos que no presentaron una inhibición significativa en comparación con los otros aislamientos, se evidenciaron géneros frecuentemente aislados como *Penicillium* spp. el cual incluye una gran cantidad de mohos conocidos por la capacidad de producir antibióticos, micotoxinas, así como de contaminar alimentos o ser patógenos oportunistas en caso de personas inmunosuprimidas. Pertenece al filo Ascomycota y eventualmente son empleados en biotecnología por producir enzimas como la celulasa como es el caso de *Penicillium pulvillum* el cual pertenece al grupo de las dos nuevas cepas lignocelulolíticas (Mariama et al.,2013) ; además cuenta con otras proteínas de interés como el ácido pulvillórico denominado como ácido graso inusual con capacidad antibiótica (Brian et al.,1957), y en el caso de *Penicillium ochrocloron* reportado desde 1967, se le reconoce por su tolerancia a metales pesados. En cuanto a la función de este género en el suelo, según Hao et al. (2020), se ha relacionado con el ciclo del fósforo, induciendo comunidades microbianas para optimizar el proceso de fijación y reciclaje de dicho elemento⁵⁴. También hay estudios en donde la inoculación de *Penicillium* sp y *Trichoderma harzianum* produjeron un aumento significativo del contenido de Fósforo disponible en el suelo, aumentó su absorción por las plantas de maíz y, en consecuencia, una mayor producción de biomasa de brotes de maíz (Mercl et al., 2020).

Con relación al último género de microorganismos aislados, se sabe que *Pseudomonas* spp. ha sido el microorganismo más empleado como agente de biocontrol desde que se buscaron alternativas sostenibles para la agricultura. Las especies más estudiadas son *P. putida* y *P. fluorescens*, la segunda con gran potencial, pero cuestionada por ser en casos específicos patógena para el humano. Sus especies habitan en suelo y contribuyen al crecimiento vegetal, síntesis de fitohormonas, producción de sideróforos, solubilización de minerales, entre otros(Álvarez-García et al , 2020).

Específicamente, la especie encontrada fue *P. cedrina*, microorganismo que ha sido estudiado como bacteria entomopatógena en larvas de *Plutella xylostella*, que en combinación con *B. Thuringiensis* logró una mortalidad significativa de las larvas (Liu et al, 2019); adicionalmente, de este microorganismo también se han evaluado los metabolitos capaces de foto-necrosis oxidativa y un estudio reciente reveló que el cultivo bacteriano produce necrosis foliar en hojas de papaya en presencia de luz solar (Mendoza et al, 2020).

CONCLUSIONES

De las muestras recolectadas, se lograron aislar 3 bacterias y 5 hongos de planta, suelo rizosférico y fruto del cultivo de gulupa con posible potencial antagonista, pertenecientes a los géneros *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp., de los cuales se ha respaldado la eficacia de muchas de sus especies como agentes de control biológico.

Los microorganismos aislados previamente se utilizaron para evaluar actividad antagónica por medio de pruebas *in vitro*, realizando un enfrentamiento dual contra patógeno *Fusarium oxysporum* aislado de gulupa, en el cual se demostró actividad antagonista de PRF, PRG y PR4 identificados como *Bacillus* spp., *Bacillus subtilis* y *Trichoderma intricatum*, respectivamente, estos fueron los 3 microorganismos presentaron mayor efecto inhibitorio en el crecimiento en comparación con los otros aislamientos.

Los demás microorganismos identificados por técnicas de biología molecular fueron *Penicillium pulvillorum*, *Penicillium ochrochloron*, *Debaryomyces nepalensis*, *Hypocrea* sp. *Pseudomonas cedrina* y *Kernia* sp., los cuales no evidenció una inhibición significativa *in vitro* contra el fitopatógeno, deben ser estudiados puesto que, pueden llegar a ser nocivos para algunos cultivos y para el ser humano.

REFERENCIAS

- Aguilar, M., Hoyos, L., y Melgarejo, L.(2012)..Respuesta fisiológica de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims) Frente al ataque por *Fusarium* spp. http://bdigital.unal.edu.co/8547/13/07_Cap05.pdf
- Akila, R., Rajendran, L., Harish, S., Saveetha, K., Raguchander. T. y Samiyappan. R.,(2011) Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) causing Fusarium wilt in banana. *Biological Control*.(57). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964411000429>
- Altieri, M., Letourneau. D.(1982). Vegetation management and biological control in agroecosystems. *Crop Protection*. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(82\)90023-0](https://doi.org/10.1016/0261-2194(82)90023-0)

- Álvarez-García, J-A., Santoyo, G., Rocha-Granados, M. del C.(2020) *Pseudomonas fluorescens*: Mecanismos y aplicaciones en la agricultura sustentable. RLRN. 16 <http://revista.itson.edu.mx/index.php/rlrn/article/view/286>
- Ansari,, M., Yadav, G., Gokhale, R., Mohanty, D. (2004) NRPS-PKS: a knowledge-based resource for analysis of NRPS/PKS megasynthases. *Nucleic Acids Research Microbiology* doi: 10.1093/nar/gkh359
- Arbelaez, G.(2000) Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombia* <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21538/22543>
- Arcila, A., Castro, D, Gonzalez, G.(2018). Valoración de la cepa *Streptomyces racemochromogenus* en el cultivo de gulupa, (*Passiflora Edulis f.edulis* sims) como método alternativo para el control de fusarium en el Municipio de Abejorral Antioquia. <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/25418/1036779139.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Brian, P., Bakera, P.,Greenb, T. y Lokerb, A. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems.*Biological Control*.140 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104095>
- Brian, PW., Curtis, PJ., Hemming, HG. y Norris GLF. Pulvilloric acid, an antibiotic obtained from cultures of *Penicillium pulvillum*. *Transactions of the British Mycological Society*. 40, 369-374 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007153657800345>
- Caicedo-Tamayo, A. y Rojas-Ospina, T. (2014). Creencias, conocimientos y uso de las TIC de los profesores universitarios. *Educación y Educadores*, 17(3), 517-533. <https://educacionyeducadores.unisabana.edu.co/index.php/eye/article/view/4333/3810>
- Caputo, A., & Pellegrini, M. (Eds.). (2019). *The anatomy of entrepreneurial decisions*. Springer.
- Castilla, D. (2019) , La exportación de gulupa superó las 8.109 toneladas y 2.013 hectáreas sembradas. *Agronegocios*, <https://www.agronegocios.co/agricultura/la-exportacion-de-gulupa-supero-las-8109-toneladas-2881324>
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F.,Jaklitschy, W., Gazis, R.,Degenkolb, T., Samuels, G.(2014). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Journal Mycologia* 107, 558-590 <https://doi.org/10.3852/14-147>

- Chaverri, P., Samuels, G. (2002) *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. https://www.researchgate.net/publication/259188197_HypocreaTrichoderma_Ascomycota_Hypocreales_Hypocreaceae_Species_with_green_ascospores
- Cole, D., Hedges, T., Ndowora T.(2008) A wilt of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims) caused by *Fusarium solani* and *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. *Tropical Pest Management* <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670879209371728>
- Cook, A. A.(1975). Diseases of tropical and subtropical fruits and nuts. New York: Hafner Press. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19756707881>
- Cucu M., Gilardia G., Pugliesea M., Lodovica M., Garibaldia . An assessment of the modulation of the population dynamics of pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in the tomato rhizosphere by means of the application of *Bacillus subtilis* QST 713, *Trichoderma* sp. TW2 and two composts. *Biological Control* [Internet].2020 [citado 1 de septiembre de 2020] Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104158>
- Delgado, J.(2006) Actividad Microbiana: indicador integral de la calidad de suelo. http://lunazul.ucaldas.edu.co/downloads/Lunazul5_6_9.pdf
- Fernández, R. y Suárez, C.(2009). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana . *Revista UNAL* 62(1) <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/24872>
- Fira, D., Dimkic, I., Berić, T., Lozo J., Stanković, S.(2018) Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Jornal Biotechnology*. *Journal of Biotechnology*. 285,44-55 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165618305844>
- Fischer, I., Rezende, J. (2008). Diseases of Passion Flower (*Passiflora* spp.) Pest Technology Global Science . *Global Science Books* https://www.researchgate.net/publication/228483390_Diseases_of_Passion_flower_Passiflora_spp#:~:text=There%20may%20be%20many%20factors,scab%20are%20the%20most%20important.
- Flórez, L., Pérez, L. y Melgarejo, L. (2012) Manual calendario fenológico y fisiología del crecimiento y desarrollo del fruto de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims) de tres

- localidades del departamento de Cundinamarca.
http://www.bdigital.unal.edu.co/8547/7/04_Cap02.pdf
- Garcés, E., Orozco, M., Bautista, GR. y Valencia, H.(2001) Fusarium oxysporum el hongo que nos falta conocer. Acta Biológica Colombiana .
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/63462/pdf>
- Giurgiu, RM., Dumitras, A., Morar, G., Scheew, P. y Schröde, FG. (2018). Un estudio sobre el control biológico de Fusarium oxysporum utilizando Trichoderma spp., En sustratos de suelo y lana de roca en un entorno controlado. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* , 46 (1), 260-269.
<https://doi.org/10.15835/nbha46110939>
- Hao, X., Zhu, Y., Nybroe, O., Nicolaisen, Mette H.(2020).The Composition and Phosphorus Cycling Potential of Bacterial Communities Associated With Hyphae of Penicillium in Soil Are Strongly Affected by Soil Origin. *Frontiers in Microbiology* . 10 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02951>
- Hernández, A., Rives, N, Acebo, Y., Diaz, A., Heydrich, M., Vera, L. (2014) Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Pyricularia oryzae* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522014000100001&script=sci_arttext&tlng=pt.
- Ho, A., Angel, R., Veraart, A., Daebeler, A., Jia, Z. y Frederiek.(2016) Biotic Interactions in Microbial Communities as Modulators of Biogeochemical Processes: Methanotrophy as a Model System. *Frontiers in Microbiology*. 7(1).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01285>
- Hoyos, L. Enfermedades en gulupa (*Passiflora edulis* Sims). Asohofrucol [Internet]
http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_135_Enfermedades_gulupa.pdf
- Instituto Colombiano Agropecuario ICA (2009) *Manejo de problemas fitosanitarios del cultivo de gulupa (Passiflora edulis Sims.) Medidas para la temporada invernal*
<https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/2262/4499260739.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Jangira, M., Pathaka, R., Sharma, S., Sharmab, S. Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Biological Control*. 127 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.018>

- Khalil, M., Shima, H. (2020). Use of biological control and bio-fertilization against Fusarium wilt disease and its effect on growth characteristics and tomato productivity. *Fungal Biology* 10(1): 71–84
https://www.creamjournal.org/pdf/CREAM_10_1_8.pdf
- Kouipou R., Eke P., Zabalgoitia I., Rodríguez B., Wakam L., Fekam F. (2016) Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from Terminalia catappa against the causative agent of Common Bean Root Rot (*Fusarium solani*). *Biological Control*. 96, 8-20.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.008>
- Lecomte, C., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Robert, F., Steinberg, C., (2016) Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review. *Biological Control* .101, 17-30
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964416301074>
- Liu, F., Lin, X., Kang, Z., Tian, H., & Liu, T. (2019) Isolation and characterization of *Pseudomonas cedrina* infecting *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. RLRN doi:10.1002/arch.21593
- Malloch, D., Cain, R. (1971). The genus *Kernia*. *Canadian Journal of Botany*. *Canadian Journal of Botany*. 49(6), 855-867. <https://doi.org/10.1139/b71-126>
- Marjama, K., Toth, K., Bromann, P., Szakacs, G., Kruus, K. (2013) Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocelluloses. *Enzyme and Microbial Technology*. 52, 358-369 <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.03.003>
- Mendoza, G., Sánchez-Tafolla, L., & Trigos, Á. (2020) Oxidative foliar photo-necrosis produced by the bacteria *Pseudomonas cedrina*. *Electronic Journal of Biotechnology*, doi:10.1016/j.ejbt.2020.01.007
- Mercl, F., García, M., Kulhánek, M., Košnář, Z., Száková, J., Tlustoš, P. (2020). Improved phosphorus fertilisation efficiency of wood ash by fungal strains *Penicillium* sp. PK112 and *Trichoderma harzianum* OMG08 on acidic soil. *Applied Soil Ecology*. 147
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139319306511>
- Miranda, D., Fischer, G., Carranza, C., Flórez, L., Piedrahíta, W., Casierra, F., (2009). *Cultivo, Postcosecha, comercialización de las pasifloráceas en Colombia, Maracuyá, Granadilla, Gulupa y Curuba*
http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_118_cultivo_poscosechavp.pdf

- Moëne-Loccoz, Y., Mavingui, P., Combes, C., Normand, P. y Steinberg, C. (2014). Microorganisms and Biotic Interactions. Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications. *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. 395-444 https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-9118-2_11
- Morales, M. A. (2018). ¿Cómo abarcar, desde el enfoque centrado en la persona, las tutorías difíciles? El Escribano, 5. <https://issuu.com/centrodescritura/docs/revistaelescribanon5>
- Morton, J. (2014) Fruits Of Warm Climates. https://www.pssurvival.com/ps/plants/Crops_Fruits_Of_Warm_Climates_2004.pdf
- Ocampo, J. (2006). Study of the genetic diversity of genus *Passiflora* L.(Passifloraceae) and its distribution in Colombia. https://www.academia.edu/32160510/Study_of_the_genetic_diversity_of_genus_Passiflora_L._Passifloraceae_and_its_distribution_in_Colombia
- Ocampo, J. (2007) Diversity of Colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation. *Biota Colombiana. Revista Humboldt*. 8(1) 1-45 <http://revistas.humboldt.org.co/index.php/biota/article/view/181/180>.
- Ocampo, J. y Wyckhuys, K.(2012). Tecnología para el cultivo de la Gulupa en Colombia (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims) Purple Passion Fruit. https://www.researchgate.net/publication/259946957_Tecnologia_para_el_cultivo_de_la_Gulupa_en_Colombia_Passiflora_edulis_f_edulis_Sims_Purple_Passion_Fruit
- Ongena, M., Jacques, P.(2018). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology* . 16(3),115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Ortiz, D. (2010). Estudio de la variabilidad genética en materiales comerciales de gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims) en Colombia <http://bdigital.unal.edu.co/3044/1/790737.2010.pdf>
- Ortiz, M., y Hoyos, L. (2012) Description of the symptomatology associated with fusariosis and its comparison with other diseases for the purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) in the Sumapaz region (Colombia). *Rev. colombiana Cienc.Hortic* <http://www.scielo.org.co/pdf/rcch/v6n1/v6n1a11.pdf>

- Portafolio (2020) Aguacate, uchuva y gulupa, con potencial exportador. <https://www.portafolio.co/economia/aguacate-uchuva-y-gulupa-con-potencial-exportador-537868>
- Purss, G.S.(1954). Identification of the species of *Fusarium* causing wilt in passion fruit vines in Queensland. *Queensland Journal of Agricultural Science*, 11, 79-81 <https://www.cabi.org/ISC/abstract/19561100591>
- Rana, K.L. y et al.(2019).Biodiversity of Endophytic Fungi from Diverse Niches and Their Biotechnological Applications Advances in Endophytic Fungal Research. *Fungal Biology*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-03589-1_6
- Rodrigues, K. Dias-Filho.Fungal, M.(1996). Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. *marandu* and *B. humidicola*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 31(12), 905-909 <https://www.researchgate.net/publication/285886204>
- Serrano, L. y Galindo, E.(2007) Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*, 78-89. <http://www.ibt.unam.mx/Geg/lineas/Control%20Biologico%20Ciencia.pdf>
- Sierra, J., Navarro, R. y Yepes, G.(2017)Efectos de la interacción de hongos micorrizo arbusculares (HMA) y *Meloidogyne javanica* en plántulas de granadilla (*Passiflora ligularis* Juss).*Bionatura*. 2(3) <http://revistabionatura.com/files/2017.02.03.4.pdf>
- Stein, T.(2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology*. 56(1) ,845-857<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Su, L., Zhu, H., Niu, Y. y et al. (2020).Phylogeny and taxonomic revision of *Kernia* and *Acaulium*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67347-1>
- Sun, R., Liu, Z., Fu, K., Fan, L., y Chen, J. (2012). Trichoderma biodiversity in China. *Journal of Applied Genetics*, 53(3), 343–354. doi:10.1007/s13353-012-0093-1
- Sundaramoorthy, S. y Balabaskar, P.(2013). Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp. against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. DOI: 10.7324/JABB.2013.1306
- Udagawa, S., Furuya, K.(1988). *Emericellopsis sphaerospora* and *Kernia peruviana*, two new soil-borne cleistothecial ascomycetes <https://pascalfrancis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=7058580>

Villarreal, M., Villa, E., Cira, L., Estrada, M., Parra, F. y Santos S. (2018) .El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. Rev. mex. fitopatol <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>

Estrategias virales para regresión de tumores causados por virus del papiloma bovino

Ruth Mélida Sánchez Mora¹²
Nicole Andrea Pico Tamayo¹³
Yenny Yolanda Lozano Jiménez¹⁴

RESUMEN

Los *Papillomavirus* son pequeños virus de ADN bicatenario, específicos de especie. En los bovinos, el VPB causa lo que comúnmente se conoce como papilomatosis bovina, una enfermedad infectocontagiosa de amplia distribución mundial con repercusiones económicas significativas, siendo considerada uno de los principales azotes de la ganadería bovina; mientras que en equinos se denomina sarcoidosis a la enfermedad producida por los mismos VPB, categorizada como la neoplasia cutánea más frecuente en caballos. Como característica de la enfermedad, en bovinos se presenta una regresión espontánea en la mayoría de los casos sin causar mayores consecuencias para los animales infectados, por el contrario, en los equinos la enfermedad es clínicamente más severa, no demuestra regresión natural y en ocasiones, conduce a la muerte del animal si no se trata de la mejor manera. Los nuevos tratamientos, especialmente para combatir la sarcoidosis equina, demuestran una mayor eficacia para conservar la vida de los animales infectados. De esta manera, el presente capítulo hace una revisión de la literatura tratando de explicar cómo se produce el fenómeno de regresión espontánea de los tumores, los factores que influyen en este proceso, resaltando el uso de vectores virales, especialmente de aquellos provenientes del Virus de la Influenza A y B, modificados genéticamente, que permiten la producción mejorada de IFN- γ , y de esta manera estimular la regresión de los tumores causados por el VPB en los equinos.

¹² PhD en Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Docente Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la Salud. rmsanchezm@unicolmayor.edu.co.

¹³ Estudiante Bacterióloga y Laboratorio clínico, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Estudiante, npico@unicolmayor.edu.co

¹⁴ Ph.D en Ciencias Farmacéuticas, Universidad Nacional de Colombia. Docente Universidad de La Salle. Asesora externa biotecnología y Genética UCMC. jylozano@unisalle.edu.co

Como metodología se realizó una búsqueda exhaustiva en bases de datos de artículos científicos y libros, especialmente publicados en el idioma inglés, con un amplio rango en los años de su divulgación, los cuales permitieron obtener información precisa para entender, con un orden lógico, la temática trabajada. Encontrando como resultado final que en el manejo y regresión de tumores se ha utilizado vectores virales basados en el Virus de la Influenza A recombinante, modificado genéticamente para eliminar su proteína NS1, la cual actúa como un factor de virulencia que dificulta la respuesta antiviral mediada por interferón de tipo I (IFN) del huésped. Estos avances son prometedores para ser usados in vivo en tratamientos para la regresión de tumores provocados por el Virus del Papiloma Bovino y además para obtener vacunas estables dirigidas contra el mismo virus.

PALABRAS CLAVE: Virus del Papiloma Bovino VPB, Papilomatosis, Sarcoidosis, Vectores virales, Regresión tumoral.

INTRODUCCIÓN

La presente revisión abarca como punto central el uso de vectores virales como opción terapéutica para la regresión de tumores causados por el Virus del Papiloma Bovino VPB; estos virus de tipo ADN, pertenecen a la familia *Papillomaviridae* y al género *Papillomavirus*, su importancia radica como agentes etiológicos de la papilomatosis bovina y sarcoidosis equina (Borzacchiello & Roperto, 2008), enfermedades crónicas e infectocontagiosas de amplia distribución mundial (Chambers *et al.*, 2003; Lancaster *et al.*, 1977). Para el caso de los bovinos, el virus ocasiona una serie de lesiones en forma de verrugas o papilomas, las cuales se comportan como proliferaciones benignas, que si bien, no afectan la vida del animal de manera alarmante, provocan consecuencias para el estado de salud del animal generando un retraso en el desarrollo, disminución en la ganancia de peso e incluso, predisposición en el organismo para adquirir infecciones secundarias de origen bacteriano (Nasir & Campo, 2008). Por otro lado, en los equinos, las manifestaciones clínicas son más severas debido a que las lesiones o sarcoides, de tipo tumoral, no demuestran una regresión natural, y se tornan recurrentes cuando el tratamiento no es el adecuado, llevando al animal, en el peor de los casos, a

la muerte (Munday, 2014; Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan & Grinwis, 2013; Valencia *et al.*, 2013).

Actualmente se proponen posibles tratamientos enfocados en la regresión de tumores ocasionados por el VPB, especialmente en equinos dada la severidad de sus manifestaciones clínicas, los cuales cuentan con un porcentaje de efectividad mayor a los tratamientos que comúnmente son usados, y además, que no representen ningún riesgo para la salud del animal al ser aplicados. Es así como se ha demostrado el uso de vectores de origen viral, especialmente basados en el Virus de la Influenza Humana A y B modificados genéticamente para eliminar de forma parcial el gen NS1, creando así tratamientos que promueven la regresión de tumores presentes en equinos, que acompañados con una estimulación adecuada de la respuesta inmune, han mostrado una gran efectividad para disminuir la cantidad de tumores presentes en equinos infectados y mitigar los daños que puede provocar el VPB en estos animales (Jindra *et al.*, 2021).

Teniendo en cuenta lo anterior, este capítulo analiza el uso de vectores virales como opción terapéutica para la regresión de tumores provocados por el VPB, así como también muestra el proceso mediante el cual se lleva a cabo la regresión de tumores presentes en animales ocasionados por el VPB, se describen los virus que participan como vectores en las terapias enfocadas en la regresión de tumores provocados por el VPB, y presenta las terapias usadas para la regresión de tumores, tanto en bovinos como en equinos, causados por el mismo virus. Como metodología para la construcción del capítulo, se realizó una búsqueda exhaustiva en bases de datos de artículos científicos y libros, especialmente publicados en el idioma inglés, con un amplio rango en los años de su divulgación, los cuales permitieron obtener información precisa para entender, con un orden lógico, la temática trabajada.

METODOLOGÍA

El tipo de investigación de este estudio es cualitativo, con alcances exploratorios, descriptivos y de correlación. Como población se tomaron un conjunto de artículos científicos consultados en diferentes bases de datos reconocidas, los cuales aparecen

tras la búsqueda inicial del concepto central de la investigación; dentro de la muestra se incluyen artículos científicos, nacionales e internacionales, indexados, que cumplan con los respectivos criterios de validez e inclusión, publicados en idioma español e inglés, comprendidos entre los años 1979 y 2021.

Se realizó una búsqueda inicial de información general, ordenada de manera lógica y secuencial, que permite descomponer el tema central desde lo más básico y conceptual como lo son las generalidades del Virus del Papiloma Bovino, sus características y patogenia, hasta su relación con las enfermedades producidas en equinos y bovinos, agregando datos sobre los tratamientos en los animales y nuevas estrategias a utilizar.

Se efectuó una consulta en bases de datos como Springer Link, Scielo, Science Direct, Pubmed, Elsevier, NCBI y Google académico, las cuales se encuentran disponibles en Internet. Se utilizaron las palabras clave como Virus del Papiloma Bovino, Papilomatosis, Sarcoidosis, Vectores virales y Regresión tumoral, en las bases de datos anteriormente mencionadas.

La selección del material consultado se realizó siguiendo los criterios previamente establecidos, y se seleccionaron el total de 48 referencias bibliográficas, siguiendo el diagrama de flujo descriptivo mostrado en la figura 1, distribuidas en el rango de fechas de 1979 hasta 2021.

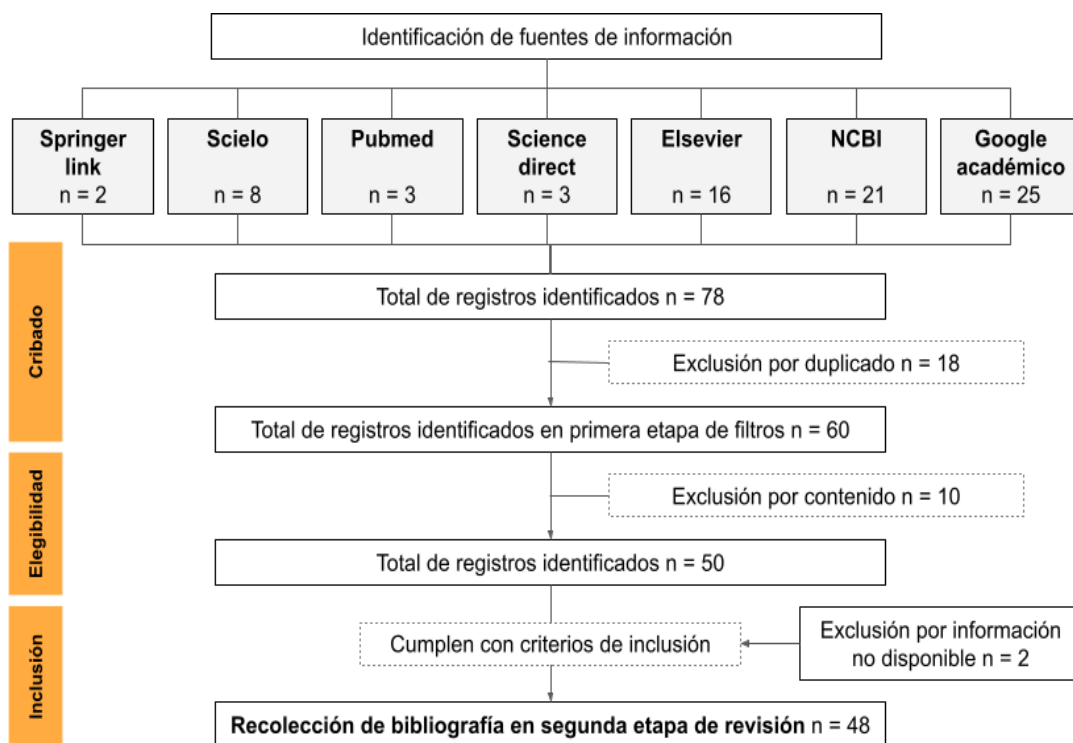


Figura 1. Diagrama de flujo descriptivo de las etapas de revisión bibliográfica para la obtención de información. Fuente: elaboración propia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

GENERALIDADES DEL VIRUS DEL PAPILOMA BOVINO (VPB)

Los papilomavirus bovinos (VPB) pertenecen al género *Papillomavirus*, virus pequeños con un genoma de ADN bicatenario, los cuales infectan a los humanos y a muchas otras especies de animales domésticos y salvajes, como es el caso de équidos y bovinos. Su principal característica es la generación de lesiones hiperproliferativas en el epitelio cutáneo y las mucosas. Los VPB se clasifican en 13 serotipos, siendo especie específicos al no infectar otro huésped que no sea el natural; sin embargo, se ha presentado una excepción con el VPB tipo 1 y 2 que infectan caballos y otros équidos (Carter *et al.*,

2004; Méndez, 2019). En la tabla No 1. se presenta la clasificación taxonómica de los VPB, según parámetros del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (en inglés *International Committee on Taxonomy of Viruses* o ICTV).

Tabla No. 1. Clasificación taxonómica del VPB

Familia	<i>Papillomaviridae</i>
Género	<i>Xipapillomavirus, Deltapapillomavirus, Epsilonpapillomavirus.</i>
Especie	<i>VPB 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13.</i>
Clasificación de Baltimore	I (Virus de ADN bicatenario)

Fuente: Adaptado de (Lunardi *et al* 2013)

El Virus del Papiloma Bovino presenta simetría icosaédrica sin envoltura de 55 a 60 nm de diámetro; contiene un ADN de doble cadena de aproximadamente 8.000 nucleótidos ensamblado por histonas celulares. Su cápside viral está compuesta por dos proteínas estructurales, L1 de 55 kDa, y L2 de 70 kDa; su genoma codifica para otras proteínas importantes en el proceso de replicación e infección en el huésped E1 a E7, al igual que proteínas estructurales. La función de cada una de ellas se aprecia en la tabla No. 2 (Lunardi *et al.*, 2013).

Tabla No. 2. Proteínas virales del VPB

TIPO	NOMBRE	FUNCIÓN
	E1	Reconocimiento del origen de replicación/actividad helicasa

Proteínas no estructurales	E2	Enganche de E1 al origen de la replicación/modulación de la transcripción de los primeros promotores virales
	E4	Supuesta función auxiliar en la salida del virión de las células infectadas
	E5	Interactúa con el receptor B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y lo activa.
	E6	Dirigida contra la proteína supresora de tumores p53
	E7	Se une a proteínas de la familia del retinoblastoma
Proteínas estructurales	L1	Componente de la cápside viral
	L2	Componente de la cápside viral

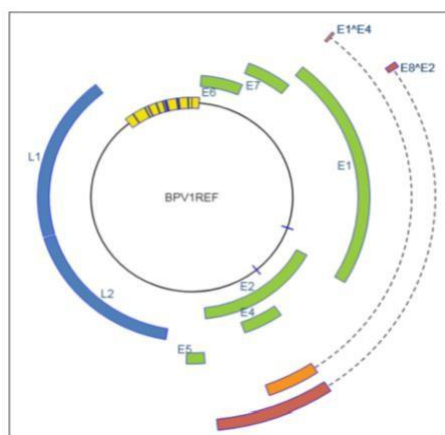
Fuente: Adaptado de (Lunardi et al., 2013)

Los *Papillomavirus* bovinos (VPB) están clasificados en tres géneros, el primero, *Xipapillomavirus*, con un tropismo especial por el epitelio, abarcan el VPB-3, VPB-4, VPB-6, VPB-9, VPB-10, VPB-11 y el VPB-12; el segundo, *Deltapapillomavirus*, asociados con fibropapilomas, que comprenden al VPB-1, VPB-2 y VPB-13; y el tercero, *Epsilonpapillomavirus*, en donde se encuentra el VPB-5, cuyo genoma comparte muchas semejanzas con los otros dos grupos de VPB, y el VPB-8 (Borzacchiello & Roperto, 2008; Carter *et al.*, 2004).

Según el grupo de Lunardi en el 2013, cada tipo viral representa un genoma completo, quienes comparten en común la secuencia de nucleótidos del gen L1, que codifica la proteína principal de la cápside, y a su vez, muestran al menos un 10% de diferencia en comparación con la misma secuencia de cualquier otro PV previamente identificado (Lunardi *et al.*, 2013; Munday, 2014).

El genoma de ADN circular de doble cadena de los *Papillomavirus*, en general está conformado por tres regiones diferentes: la región de control largo LCR, por sus siglas en inglés *long control region*, que contiene los elementos necesarios para la replicación y transcripción del ADN viral, y dos regiones que contienen marcos de lectura abiertos ORFs, por sus siglas en inglés *open reading frames*, correspondientes, por un lado, a genes tempranos, y por otro lado, a genes tardíos. Esta característica de expresión temprana o tardía depende de si se expresan antes o después de realizar la síntesis de ADN destinado a la creación de nuevas partículas virales (Corteggio *et al.*, 2013; Guzmán López *et al.*, 2010). Se puede observar en la figura 2 que los primeros genes codifican proteínas implicadas tanto en la replicación y transcripción del ADN viral como en la transformación celular, así como E1, E2, E4, E5, E6 y E7; los segundos genes codifican proteínas de la cápside, es decir L1 y L2 (Borzacchiello & Roperto, 2008; Santos-López *et al.*, 2015).

Figura 2. Genoma del VPB tipo 1 indicando las distintas regiones codificantes



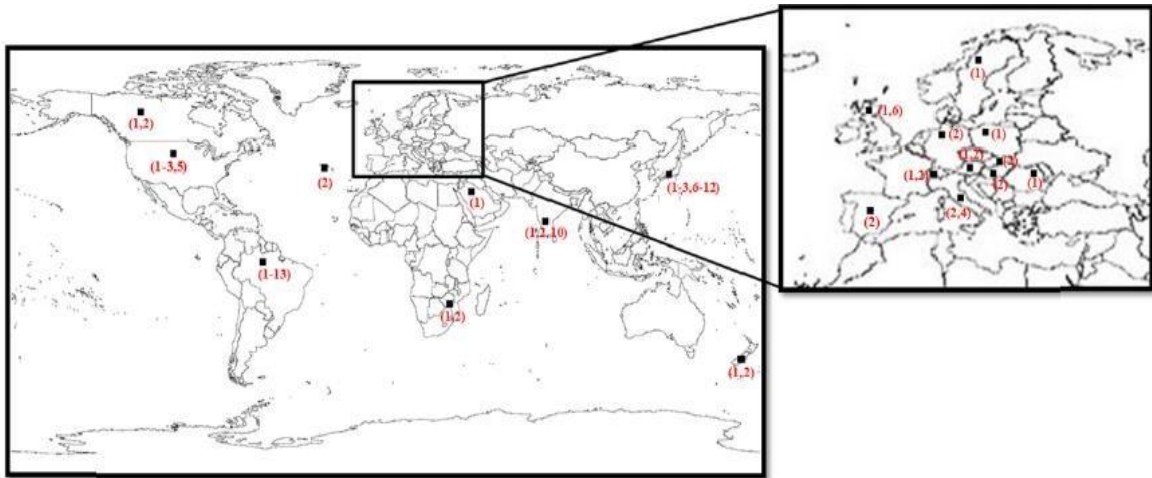
Fuente: Adaptado de (Van Doorslaer *et al.*, 2017)

EPIDEMIOLOGÍA DE VPB

Según reportes de la literatura, las infecciones por papilomavirus bovino se han presentado a nivel mundial con una distribución por genotipos como se aprecia en la figura 3. Es importante destacar que cada uno de éstos se distribuyen de manera

heterogénea y que algunos representan una incidencia mayor en diferentes lugares del mundo. Así, los genotipos que tienen mayor prevalencia al estar presentes en una mayor cantidad de países son el genotipo VPB-1 y VPB-2, dónde el VPB-1 se ha reportado en Arabia Saudí, Nueva Zelanda, Brasil, India, Japón y Suecia, mientras que el VPB-2, en Alemania, Brasil, Japón, Italia, Portugal, Rumania, Nueva Zelanda y España. Por otro lado, para los genotipos VPB-3, VPB-7, VPB-8, VPB-9, VPB-11 y VPB-12, se conoce reportes únicamente en Japón y Brasil, y en un único caso de papilomatosis en un bisonte en Eslovaquia. El VPB-4 se ha encontrado en Brasil e Italia, el VPB-5 en Brasil y el VPB-6 en Brasil, Reino Unido y Japón, el VPB-10 en Brasil y Japón, y, por último, el VPB-13, más recientemente encontrado en Brasil (Díaz *et al.*, 2012).

Figura 3. Distribución mundial de los genotipos de papilomavirus bovinos BPV-1 al BPV-13



Fuente: Adaptado de (Díaz *et al.*, 2012).

En Colombia se han registrado infecciones provocadas por el VPB, de manera precisa, se han reportado casos a lo largo del territorio colombiano así: en la zona Norte de Antioquia; en la zona del sur-oriental de Santander, comprendiendo los municipios de San Gil, Socorro, Guadalupe, Oiba, San José, Barichara, Charalá y Pinchote; en el departamento del Cauca, en los municipios de Santander de Quilichao, Popayán, El Bordo, Timbio, Cajibío y Sotará; en el departamento del Caquetá, en los municipios de Montañita y Puerto Rico; y por último, en el departamento de Córdoba, lo que representa menos de 25% del territorio colombiano (Bolaños *et al.*, 2017; Cardona-Álvarez *et al.*, 2018; Orrego *et al.*, 1979; Valencia *et al.*, 2013; Villafañe *et al.*, 1984).

INFECCIÓN CAUSADA POR VPB EN BOVINOS Y EQUINOS

En general, los huéspedes de estos virus comprenden varias especies, principalmente mamíferos y aves (Diniz *et al.*, 2009; Frias-De-Diego *et al.*, 2019). De manera característica en los VPB se han detectado saltos entre especies principalmente de los serotipos VPB-1 y VPB-2, infectando también a équidos, búfalos y bisontes, dando lugar a afecciones más complicadas denominadas sarcoides (Corteggio *et al.*, 2013; Nasir & Campo, 2008; Shafti-Keramat *et al.*, 2009). De manera particular, se conoce que los conejos fueron la primera especie animal afectada por virus de la familia *Papillomaviridae*, en quienes se demostró, también, la tumorigénesis como consecuencia de esta infección (Campo, 2002).

El VPB se propaga fácilmente por contacto directo entre animales infectados, con mayor facilidad entre los que están estabulados, a través de lesiones cutáneas, sangre contaminada y fómites, capaces de transmitir el virus, como cercas infectadas, narigueras, agujas hipodérmicas, instrumentos quirúrgicos, entre otros; además por manipulación de los animales con las manos del ordeñador, e incluso gracias a vectores artrópodos, principalmente garrapatas y tábanos, los cuales transportan el virus y facilita su entrada en los animales en el momento que ocasionan pequeñas lesiones en la piel sana cuando pican o muerden a los mismos (Cardona-Álvarez *et al.*, 2018; Méndez, 2019).

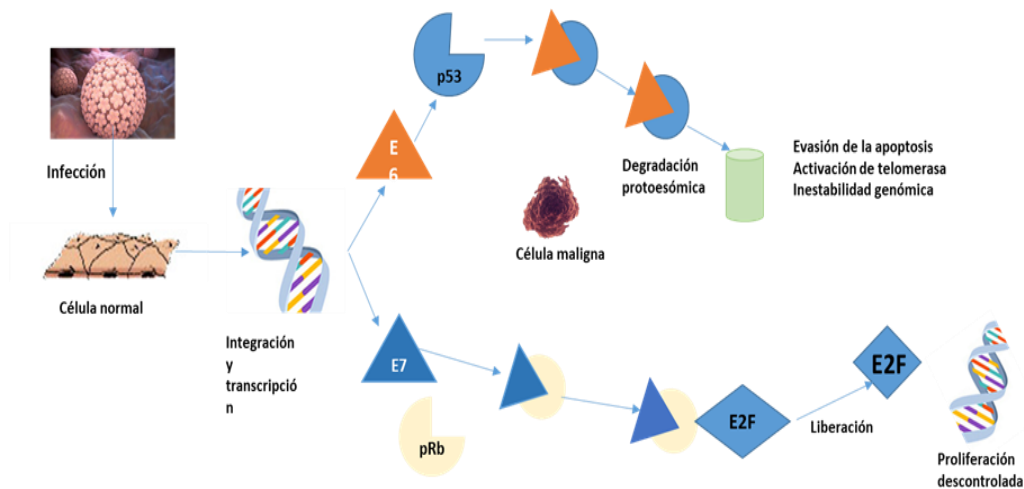
Al tener contacto con la piel, el virus infecta directamente a los queratinocitos basales del epitelio, en donde se replican exclusivamente en el núcleo, posteriormente se replica en los queratinocitos del estrato espinoso y granuloso ocasionando hiperplasia (crecimiento excesivo) del epitelio. Una vez infectada la célula, el virus puede seguir tres posibles vías:

1. El virus puede causar una infección latente sin cambios morfológicos en los queratinocitos.
2. En las células basales maduras, el virus puede pasar de una infección latente a una productiva con formación de viriones completos infectantes, dando lugar a cambios morfológicos conocidos como citopatología viral, que incluyen hiperplasia epitelial, queratinocitos con citoplasma claro, núcleos picnóticos, y algunas veces cuerpos de inclusión intranucleares y/o intracitoplasmáticos.

3. El virus se puede integrar al genoma de la célula del huésped, resultando en transformación maligna de la célula y cambios morfológicos de neoplasia maligna (Méndez, 2019).

Tanto los cambios morfológicos como la hiperplasia celular, se debe a que los genes virales E5, E6 y E7, están asociados con la regulación del ciclo celular y con el proceso de promover el crecimiento celular al inactivar proteínas supresoras tumorales como el p53 y pRb; E6, al unirse a p53, induce su degradación proteosómica, lo que resulta en evasión de la apoptosis y el incremento de la inestabilidad cromosómica. Por su parte, la oncoproteína E7 al unirse a pRb activada la degrada y libera el factor de transcripción E2F que favorece la expresión del factor de crecimiento E2F1, dando como resultado una proliferación celular descontrolada (Figura 4), con una nula capacidad para reparar el material genético provocando así una transformación maligna (Campo, 2002; Méndez, 2019).

Figura 4. Mecanismo de carcinogénesis en la infección por Papilomavirus. Tomado y modificado de tipificación viral y características inmunopatológicas de la fibropapilomatosis bovina en diferentes regiones de San Luis Potosí.



Fuente: Tomado y modificado (Méndez, 2019).

Así mismo, dependiendo el género del *papillomavirus*, las infecciones que se producen van a tener características diferentes; así, las ocasionadas por los *Deltapapillomavirus*, van a transformar los fibroblastos subepiteliales, produciendo posteriormente una acantosis epitelial y papilomatosis; las infecciones ocasionadas por los *Xipapillomavirus*, provocan únicamente la transformación del epitelio, mientras que las causadas por los *Epsilonpapillomavirus*, causan tanto fibropapilomas como papilomas epiteliales (Borzacchiello & Roperto, 2008).

PRINCIPALES ONCOPROTEÍNAS TRANSFORMADORAS PRESENTES EN EL VPB

La proteína E5 presente en VPB 1 y VPB 4, es una proteína transmembrana de tipo II, mayormente hidrofóbica, situada entre las cadenas de ácidos grasos de los lípidos de la membrana, la cual atraviesa la membrana una sola vez, y que actúa como la principal proteína transformadora del VPB (Corteggio *et al.*, 2013). En primer lugar, se une y activa al receptor del factor β de crecimiento derivado de plaquetas PDGF-R en células ya transformadas, formando complejos estables junto con el receptor, provocando su dimerización. Al estimular a PDGF-R se activa una cascada de señalización del receptor, que, en consecuencia, induce el crecimiento intracelular. Por otro lado, E5 también se une a la subunidad c de ductina, un componente de las vías comunicantes y la ATPasa vacuolar, provocando una regulación negativa de la comunicación intracelular de la célula infectada con sus vecinas sanas. Esta interacción provoca también la alcalinización del aparato de Golgi y los endosomas, impidiendo la salida de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de tipo I. Su ausencia en la superficie de las células facilita la evasión de la respuesta inmune del huésped. Además, la oncoproteína E5 activa algunas enzimas quinasas como Acdk-2, MAP, JNK, PI3 y c-Src impidiendo que se desarrolle de manera correcta el control del ciclo celular (Chambers *et al.*, 2003).

La segunda proteína transformadora más importante del VPB es E6, cuya localización varía entre pequeñas fracciones de membrana y núcleo, y contiene dos dominios de dedos de zinc reconociéndose como una proteína activadora de la transcripción con unión al ADN. La función transformadora de E6 la realiza mediante la unión a dos moléculas. Primero a la proteína de unión a calcio ERC-55/E6BP, y segundo al coactivador transcripcional CBP/p300. La unión de estas proteínas con la influencia de

E6 interfiere en las funciones celulares normales. Adicionalmente, la oncoproteína E6 se une a la proteína de adhesión focal paxilina, provocando una interrupción en el citoesqueleto, cuya función es vital para el mantenimiento de la morfología celular, la motilidad, la división y las interacciones de la célula con otras células y con la matriz celular; E6 también se une a la subunidad γ del complejo adaptador de clatrina AP-1, obstruyendo las vías del tráfico vesicular, importantes para el control de la proliferación y diferenciación celular (Chambers *et al.*, 2003; Corteggio *et al.*, 2013).

Por otra parte, el gen E7 codifica a una proteína de unión a zinc de 127 aminoácidos, denominada E7, que mejora la actividad de las oncoproteínas E5 y E6 en la transformación celular. Esta proteína, provoca una sobreexpresión de la integrina $\beta 1$, importante para el proceso de regulación de la proliferación y diferenciación de los queratinocitos en el huésped; y también, interfiere en las respuestas celulares que conducen al rechazo de tumores, al inhibir algunos factores responsables de la regulación del ciclo celular; además, interactúa con p600, una proteína de 600 kDa que desempeña un papel importante en la supervivencia celular y en la morfogénesis (DeMasi *et al.*, 2007).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Papilomatosis bovina: El signo más característico de esta enfermedad corresponde a la aparición de pequeños crecimientos nodulares en la piel, conocidos como verrugas, que se observan a simple vista, como se evidencia la figura 5; en la mayoría de las ocasiones tienen una regresión espontánea, o duran hasta un tiempo máximo de 18 meses, hasta que se necrosan y se desprenden de la piel del animal. De igual manera, el resto de signos clínicos van a aparecer dependiendo del lugar en donde se ubiquen las lesiones. Por ejemplo, si se localizan en espacio interdigital son dolorosos y pueden provocar cojeras o postración. En el sistema gastrointestinal, es poco común que presenten síntomas clínicos evidentes, aunque pueden provocar pérdida de apetito o distensión abdominal. En la glándula mamaria, pueden dificultar la extracción de leche o complicarse con infecciones secundarias, dando lugar a mastitis. En la vagina o el pene, pueden causar interferencias durante el coito, sangrado, infección y obstrucción, lo que puede afectar la reproducción. (Cardona-Álvarez *et al.*, 2018; Méndez, 2019).

Figura 5. Ubicación de las lesiones en bovinos con papilomatosis cutánea. a) Cabeza y cuello y b) Dorso y tórax. Adaptado de Caracterización clínica, histopatológica e histoquímica del papiloma cutáneo en bovinos (*Bos taurus*) del departamento de Córdoba, Colombia.



Fuente: Cardona-Álvarez *et al.*, 2018.

De manera específica, los serotipos del 1 al 6 se distribuyen de diferentes maneras en el cuerpo de los animales así: los serotipos VPB-1 y VPB-2 ocasionan papilomas en la zona de la cabeza, cuello y hombros, además de localizarse en el pene y la mucosa vaginal; el serotipo VPB-3 causa papilomas cutáneos persistentes; el serotipo VPB-4 está implicado en la aparición de papilomas en el tracto digestivo; el serotipo VPB-5 causa papilomas en el pezón de tipo “grano de arroz”; y el serotipo VPB-6 ocasiona papilomas aplanados (en forma de fronda) también en el pezón (Carter *et al.*, 2004).

Sarcoidosis equina: La sarcoidosis equina constituye una enfermedad que genera tumores dermatológicos en caballos, burros, mulas y cebras (Nasir & Brandt, 2013; Nasir & Campo, 2008). A diferencia de los papilomas bovinos, los sarcoides equinos no demuestran regresión natural ni espontánea, y, aunque no hacen metástasis, pueden ser recurrentes si no se tratan de manera adecuada. En la literatura se han descrito diferentes tipos clínicos, tal como se observa en la figura 6. El tipo fibroblástico presenta ulceración agresiva en la epidermis; los tipos ocultos corresponden a placas alopecias planas, con hiperqueratosis o presencia de nódulos en su superficie; los

sarcoides nodulares son masas redondas que no ocasionan ningún tipo de daño al epitelio, pero la piel suprayacente puede desprenderse o adherirse a la porción fibroblástica del tumor; los sarcoides de tipo verrugoso tienen una apariencia de protuberancias de pequeño tamaño, típica de las lesiones provocadas por los virus del papiloma. Con frecuencia, se observan casos de animales que presentan sarcoides mixtas, compuestas por dos o más tipos de sarcoides. Las lesiones de tipo nodular, verrugoso y oculto suelen permanecer estables a lo largo del tiempo por muchos años, y de manera espontánea, cambiar drásticamente y evolucionar a un tumor que crece rápido, generalmente de tipo fibroblástico, que es muy difícil de tratar (Bogaert *et al.*, 2007).

Figura 6. Cuatro tipos clínicos de sarcoide equina. (a) Sarcoides fibroblásticos en el abdomen ventral; (b) sarcoides ocultas en el hombro; (c) sarcoide nodular en el párpado superior; (d) sarcoide verrugoso en la mandíbula



Fuente: Adaptado de (Bogaert *et al.*, 2007).

A partir de las características de las lesiones como localización, tamaño, número, su tendencia a resistir el tratamiento farmacológico, esta enfermedad puede comprometer de manera integral el bienestar y estado natural de los animales afectados y causar pérdidas económicas para los sistemas que de ellos dependen, siendo importante el desarrollo de nuevas terapias que sean verdaderamente efectivas y que no provoquen efectos secundarios al ser aplicadas en los animales, para garantizar una mejor supervivencia y optimización de los recursos económicos, cuando sea el caso.

OPCIONES TERAPÉUTICAS PARA TRATAR EL VPB

En la mayoría de los casos las lesiones papilomatosas retroceden naturalmente sin causar consecuencias más graves al animal infectado, pero en situaciones particulares, relacionadas con una mala higiene o cuidados inadecuados, las lesiones pueden ser recurrentes, además de persistir y progresar en carcinomas, y es aquí cuando se vuelve indispensable una intervención terapéutica para tratar y erradicar la infección por completo. El tratamiento de estas enfermedades ha estado limitado pues no hay medicamentos que demuestren una efectividad del 100%, y es por esto que se han desarrollado gran variedad de tratamientos con el fin de controlar la infección por el VPB (Archana *et al.*, 2019; Namgyel *et al.*, 2021).

Dentro de los tratamientos usados para el control de la infección causada por el VPB tanto en equinos como en bovinos, se encuentra una amplia variedad de procedimientos y medicamentos con una efectividad variada. Por ejemplo, la cirugía se lleva a cabo únicamente cuando las lesiones presentes en el cuerpo del animal son pocas, removiendo la totalidad de las verrugas, lo cual lo convierte en un procedimiento poco práctico, que en la mayoría de casos no se realiza. Por otro lado, la vacunación es otra de las formas más comunes de tratamiento y prevención de la enfermedad (Archana *et al.*, 2019; Bolaños *et al.*, 2017). Las vacunas que se han implementado desde el año 1990 están basadas en el uso de la proteína BPV L1 obtenida de manera recombinante de organismos procariotas, y también en la obtención de partículas sintéticamente similares al virus mediante el uso de células eucarióticas, que tienen como propósito inducir inmunidad en el huésped, pero que no demostraron una protección eficaz contra la infección (Ugochukwu *et al.*, 2019). Adicionalmente, las vacunas autógenas que se elaboran con sangre o tejidos de verrugas de animales infectados también se implementan como medida de control, pero no es efectiva en la mayoría de los animales afectados (Ugochukwu *et al.*, 2019; Valencia *et al.*, 2013).

Otras alternativas son el uso y suministro de medicamentos como el 4.4 Diaceturato de Diazoaminodibenzamidina, el clorobutanol, inmunomoduladores como la ivermectina y el levamisol, infusiones intravenosas de bismuto, amonio, ácido salicílico, etilenodinitrilo tetracetato de calcio, cobre o cloruro de magnesio. Por otra parte, se dispone de alternativas terapéuticas que incluyen el uso de células inactivadas de *Propionibacterium* hasta medicina homeopática con el empleo del extracto de *Thuja*

occidentalis (Bolaños *et al.*, 2017; Namgyel *et al.*, 2021; Ugochukwu *et al.*, 2019; Valencia *et al.*, 2013).

Particularmente, para la sarcoidosis equina no existe una terapia eficaz que facilite el tratamiento de los animales afectados, y como esta enfermedad es clínicamente más severa, se recurre a procedimientos como la escisión, la crioterapia y la inmunomodulación local, que, en la mayoría de los casos no presenta los resultados esperados. La escisión quirúrgica presenta consecuencias pues provoca en el animal afectado una hiperproliferación de las lesiones, debido a la activación del VPB que está latente en el tejido aparentemente normal que rodea la lesión (Chambers *et al.*, 2003). Ante estos resultados, en los últimos años se han desarrollado vacunas basadas en vectores del virus de la influenza A y B que inducen la regresión de tumores, las cuales prometen un futuro alentador para todos los animales afectados con el VPB (Jindra *et al.*, 2021).

REGRESIÓN DE TUMORES OCASIONADOS POR EL VPB

La regresión de tumores es un proceso que puede ocurrir de manera espontánea, tanto para el tumor primario, como para su metástasis, y recibe este nombre debido a que se produce una disminución en el tamaño del tumor, provocando “la desaparición parcial o completa de un tumor maligno en ausencia de tratamiento o en presencia de terapia considerada inadecuada para ejercer una influencia significativa sobre la enfermedad” (Papac, 1996). Para los cánceres que se establecen en el epitelio, el sistema inmunológico es quien desempeña el papel principal para que se desencadene la regresión de tumores, al detectarse la presencia aumentada de linfocitos T, y algunas citoquinas (Salman, 2016).

Los tumores ocasionados por el VPB contienen una gran cantidad de células inmunitarias, citoquinas inflamatorias como IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-17A, IFN- α e IL-12p70, y antígenos diana, que en conjunto constituyen un tipo de tumor inmunológicamente “caliente”. Cuando se desencadena la respuesta inmune, aumenta la transcripción de genes regulados por IFN- γ , demostrando que la participación de IFN es importante para la inmunovigilancia de estas lesiones (Zeng *et al.*, 2021).

En investigaciones recientes en las que ha sido utilizado el modelo murino para definir el papel que cumple el IFN- γ en el rechazo de tumores, se ha destacado la respuesta del IFN- γ en procesos de regresión espontánea de tumores, y, debido a este comportamiento, se ha definido el papel que cumple el interferón en el control de tumores ocasionados por algunos papilomavirus utilizando un modelo “regresor” de tumores epiteliales. Es así como se demuestra que para que se produzca el interferón, los linfocitos T CD8⁺ cumplen un papel fundamental, quienes, al ser activados por los linfocitos T CD4⁺ brindando una fuente temprana de IL-2, promueven la fase efectora en la que se destruye el estroma tumoral de manera más efectiva, y se aumenta la producción de IFN- γ dentro del microambiente tumoral. Por otro lado, cuando no se produce de manera efectiva el IFN- γ , se disminuye la producción de quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CCL5 dentro de la masa tumoral, y, en consecuencia, una reducción en el número de linfocitos T capaces de infiltrar en el tumor. Los ligandos CXCR3, CXCL9, CXCL10 y CXCL11 aumentan en cantidad a medida que avanza la formación del tumor (Zeng *et al.*, 2021).

Así como se observa en la figura 7, la secreción de CXCL10 proveniente de las células tumorales es inducida por el IFN- γ , siendo fundamental para que se establezca la unión de estas quimiocinas CXCL10 y CXCL11 junto con su ligando CXCR3, producido por los linfocitos T CD8⁺, para controlar el crecimiento de los tumores. Es así como se podría concretar que el IFN- γ producido por las células T CD8⁺ dentro del tumor actúan en un ciclo de retroalimentación para inducir la expresión de CXCL10 en las células tumorales, conduciendo a una mayor expresión de CD8⁺. Pero no solo los LT CD8⁺ liberan IFN- γ . Otras células pertenecientes al sistema inmune innato como las células natural killer (NK), las células dendríticas (CD), los macrófagos y las células T $\gamma\delta$ estimulan la liberación del interferón apoyando la producción temprana de esta citoquina para desencadenar la respuesta inmune (Zeng *et al.*, 2021).

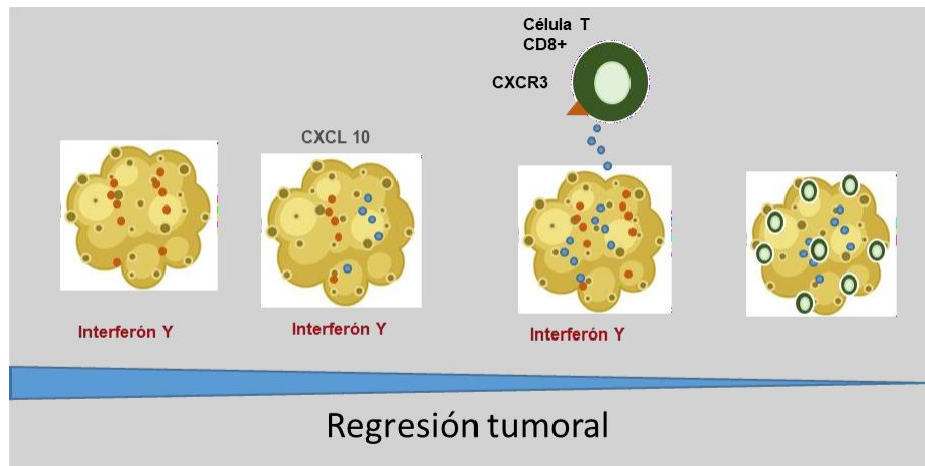


Figura 7. Proceso de regresión tumoral en el cual está involucrado el IFN- γ producido por las células T CD8+, y la quimiocina CXCL10, con su correceptor CXCR3. Tomado y modificado de (Zeng et al., 2021).

VECTORES VIRALES COMO OPCIÓN TERAPÉUTICA EN LA REGRESIÓN DE TUMORES

El uso de virus como posibles vectores para tratamientos enfocados hacia diferentes enfermedades tiene una amplia trascendencia. Los vectores virales están disponibles, según el efecto deseado, pues son altamente inmunogénicos facilitando la propagación del antígeno, o material genético del mismo, debido a que se replican dentro de las células huésped, además de demostrar tasas de infección significativamente importantes (Lin *et al.*, 2010).

Algunos de los virus que se usan como vectores virales son el Adenovirus, Virus Adenoasociados, el Virus de la Viruela Aviar y el virus Vaccinia. De manera más detallada, el virus Vaccinia es un vector prometedor, al contar con un gran genoma y por su naturaleza altamente infecciosa, reduciendo la patogenicidad producida principalmente por las oncoproteínas E6 y E7. Por otro lado, los Adenovirus y Virus Adenoasociados, son usados ampliamente debido a la facilidad que demuestran para estimular una respuesta inmune del huésped de manera más eficaz, al mejorar el procesamiento del antígeno presentado al Complejo Mayor de Histocompatibilidad de

clase I CMH-I de diferentes maneras, promoviendo una mejor atención a la infección (Chabeda *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2010).

Según el grupo de Wu *et al.* 2010, para las terapias antitumorales también son usados los vectores virales de tipo ARN, como el Virus del Bosque de Semliki (SMV), el cual induce respuesta de linfocitos T citotóxicos inhibiendo la angiogénesis tumoral. En esta familia también se encuentra el virus de la Encefalitis Equina Venezolana (EEV) y el Virus Sindbis (SIN) (Lin *et al.*, 2010); quienes, al tener la capacidad de autoreplicarse, dan como resultado una expresión más sólida del antígeno, y, en consecuencia, una mayor inmunogenicidad (Chabeda *et al.*, 2018). Sin embargo, el uso de vectores vivos lleva consigo un riesgo de seguridad, principalmente para pacientes inmunosuprimidos, situación que se agrava con la posibilidad de aparición de anticuerpos neutralizantes, los cuales limitan las inmunizaciones repetidas, y la posibilidad de que exista una inmunidad previamente establecida al vector en uso (Chabeda *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2010).

Por otra parte, el grupo de Brandt (2021), planteó la posibilidad de un nuevo tratamiento útil para la regresión de tumores causados por el VPB, específicamente en equinos, teniendo en cuenta que los sarcoides comprometen de manera severa la salud y bienestar de los animales, debido a la tendencia a resistir al tratamiento y reaparecer de forma más grave. Así pues, los investigadores desarrollan vectores del Virus de la Influenza A y B, que contienen un gen NS1 truncado, que asegura la inducción de interferón y, además, coexpresa las oncoproteínas del VPB 1 E6 y E7.

Además, en el estudio realizaron un ensayo que involucró a 29 caballos portadores de sarcoide inducido por VPB 1, a los cuales se les inyectó intratumoralmente los vectores denominados iNSA/E6E7 y/o iNSB/E6E7. El tratamiento indujo una respuesta antitumoral sistémica reflejada por la regresión sincrónica de las lesiones inyectadas y no inyectadas. Se demostró la regresión completa del tumor en 10/29 caballos. Nueve de estos pacientes gravemente afectados con un historial de intentos terapéuticos fallidos no respondieron o solo transitoriamente al tratamiento (Jindra *et al.*, 2021). Por consiguiente, las vacunas basadas en vectores INSA/E6E7 e iNSB/E6E7 demostraron

ser seguros y efectivos para reducir significativamente la carga tumoral incluso en casos graves.

En los últimos años se ha investigado e implementado el uso de virus de plantas para el desarrollo de vacunas y otras sustancias terapéuticas. Es así como se han diseñado vectores de expresión de primera, segunda y tercera generación que difieren entre sí en cuanto a su mecanismo de acción. Los vectores de primera generación utilizan el virus completo, el cual contiene el genoma completo con el gen de interés expresado desde el mismo ORF que la proteína de la cubierta, ya sea como parte de una proteína de fusión o también en otro promotor adicional que es incorporado al genoma viral. Por otro lado, los vectores de segunda generación no tienen limitación en el tamaño de los genes que se quieren insertar. Estos son una versión mejorada de la primera generación al tener niveles de producción mejorados al estar compuestos únicamente por los componentes mínimos que el virus requiere para la replicación, más el gen extraño de interés (Hefferon, 2017).

En especial, la tercera generación ha demostrado gran utilidad como opción terapéutica para tratar el cáncer. Esta última generación utiliza los virus de plantas como nanopartículas que provocan una respuesta inmunológica localizada contra las células cancerosas, constituyendo una gran ventaja pues esta respuesta no es tóxica y además es biodegradable. Allí aparece el Virus X de la Papa (PVX) y el Potexvirus del Mosaico de la Papaya (PapMV), los cuales pueden ser administrados intratumoralmente, al actuar como nanopartículas, provocando una regresión del tumor. En particular, PapMV tiene propiedades inmunoestimuladoras provocando una respuesta mediada principalmente por INF α , y, al ser endocitado de manera rápida por las células presentadoras de antígeno, esta respuesta inmune es acompañada de una significativa proliferación celular de linfocitos T CD8⁺ (Hefferon, 2017).

Por todos los beneficios y ventajas que confieren estos vectores virales obtenidos de plantas, principalmente para las terapias antitumorales, es importante que se continúe con la investigación y desarrollo enfocados en los muchos usos que pueden tener; además de su producción a nivel farmacéutico para aplicarlos posiblemente en el tratamiento de papilomas y sarcoides ocasionados por el VPB, buscando beneficiar

tanto a bovinos como a equinos, en los que se estimule de mejor manera la regresión tumoral.

TERAPIAS DE INMUNIZACIÓN PARA LA REGRESIÓN DE TUMORES

Inmunización directa: de manera experimental, se ha demostrado la regresión de lesiones papilomatosas en bovinos gracias a una inmunización directa con antígenos virales que provoca una respuesta inmunitaria en los animales. De manera más específica, se realizó un estudio en terneros de 8 a 12 semanas de edad, a quienes se inoculó partículas del VPB-4 demostrando la regresión espontánea de tumores acompañados por infiltraciones de linfocitos CD4+ y CD8+. Estos resultados han sido comparados de manera similar con papilomas que retroceden posteriormente al tratamiento con la vacunación o con inmunoterapia intralesional con *Corynebacterium parvum* (Knowles *et al.*, 1996).

Inmunización recombinante: la producción de péptidos de E7 específicos del VPB-4 utilizando *E. coli* también ha sido efectiva para inmunizar a bovinos, en los cuales se induce el rechazo de tumores previamente establecidos, acompañado, como normalmente ocurre, de una respuesta inmune celular. Esto demuestra que en los bovinos, una adecuada inmunización con la oncoproteína E7 puede provocar una respuesta inmune suficiente para inducir la regresión de tumores, y ser usado como vacuna profiláctica y terapéutica en los casos de papilomatosis bovina (Campo *et al.*, 1993).

Adicionalmente, se han obtenido otras proteínas recombinantes de *E. coli* para vacunas, como la L1 y L2 del VPB-2. En primer lugar, la proteína L1 induce inmunidad, propiedad conservada aún en la producción recombinante de la proteína, lo cual demuestra que la respuesta inmune es consecuente al reconocimiento de antígenos en el virión. En condiciones experimentales, la regresión del tumor ocurre aproximadamente 12 meses después de la infección, pero prevalece el estadio de ulceración de la lesión. En segundo lugar, la proteína L2 permanece interna en el virión, es decir, no se expone fácilmente al sistema inmune del huésped, pero aunque ocurra esta condición, la ulceración del tumor facilita la respuesta inmune frente a la lesión (Jarrett *et al.*, 1991; Selvakumar *et al.*, 1995). Asimismo, la inmunización con otras

proteínas de tipo no estructurales que puedan inducir respuesta inmune de tal manera que provoque la regresión del papiloma, pueden ser la E1, E2, E6 y E7 (Selvakumar *et al.*, 1995).

En la actualidad la papilomatosis bovina presenta una regresión espontánea en la mayoría de los casos, donde los animales infectados sobreviven sin que esto traiga repercusiones negativas para su desarrollo, por esto no se desarrollan tratamientos más específicos que promuevan la regresión de tumores, sino que, por el contrario, se utilizan técnicas y procedimientos más naturales y rudimentarios en estos ambientes.

TERAPIAS UTILIZADAS PARA LA REGRESIÓN DE TUMORES EN EQUINOS

TERAPIAS GENERALES

La sarcoidosis equina no cuenta con un tratamiento *gold standard* que demuestre ser efectivo como terapia para el 100% de los casos de équidos afectados con el VPB. Teniendo en cuenta lo anterior, es frecuente que se incurra en errores al momento de tomar decisiones clínicas, lo cual puede repercutir negativamente en el desarrollo de la enfermedad, llegando a provocar resultados catastróficos (Knottenbelt, 2019; Sprayberry & Robinson, 2014). Algunas de las técnicas y procedimientos más usados con diferentes grados de éxito incluyen la intervención quirúrgica, ya sea por métodos convencionales o con el uso de láser de dióxido de carbono CO₂, la crioterapia, la hipertermia, la radioterapia, la quimioterapia, la inmunomodulación tópica y los agentes antivirales (Taylor & Haldorson, 2013).

Es importante mencionar que el tipo de terapia que se escoja depende del tipo y ubicación de la lesión y de la disponibilidad de herramientas que pueden ser usadas en el momento de tratar al paciente. Por ejemplo, la radiación es la mejor opción para tratar el sarcoide periocular pero demuestra dificultades en cuanto al acceso y disponibilidad. Por otro lado, dentro de la radioterapia existen varias opciones dentro de las cuales se puede escoger el método de administración, ya sea plesioterapia, braquiterapia y teleterapia, y el tipo de radiación, entre los que se encuentran electrones, radiación gamma o rayos X (Knottenbelt, 2019).

La opción terapéutica que se emplea con mayor frecuencia es la quirúrgica, que puede ser realizada de diferentes maneras, pero presenta grandes limitaciones en cuanto al tipo, la ubicación y extensión de la lesión. Generalmente los sarcoides más pequeños y accesibles para intervención quirúrgica pueden ser extirpados más fácilmente y no presentan gran riesgo para la salud del animal; mientras que, los sarcoides gravemente invasivos son más difíciles de erradicar, y frecuentemente han demostrado recurrencias debido a que posterior a la cirugía, se produce una siembra con células provenientes del tumor, y la enfermedad puede llegar a ser clínicamente más severa y agresiva. Para contrarrestar estos problemas, la intervención quirúrgica puede ser combinada con algunos métodos complementarios como la quimioterapia y radioterapia (Knottenbelt, 2019; Sprayberry & Robinson, 2014).

Otro tratamiento que puede ser usado es la hipertermia, consiste en el sometimiento de las lesiones a una temperatura de 50 °C por aproximadamente 30 segundos usando un dispositivo de hipertermia que funciona con radiofrecuencia. Este procedimiento puede inducir la regresión de tumores durante al menos 7 meses en casos de sarcoidosis equina, y lo hace a través de la inducción de apoptosis en las células tumorales en respuesta directa al calor. Sin embargo, se presentan muchas limitaciones pues solo se pueden tratar tumores de menos de 1 cm de diámetro a la vez, y por esta razón no es muy recomendado en la mayoría de los casos (Taylor & Haldorson, 2013).

INMUNIZACIÓN POR MEDIO DE VACUNAS

Las terapias de inmunización por medio de vacunas también han sido muy usadas, especialmente aquellas compuestas con partículas similares al virus, demostrando resultados particulares de regresión de tumores solo en la mitad de los équidos sometidos a tratamientos. Estos hechos demuestran que es necesario que se desarrollen investigaciones enfocadas en el campo del desarrollo de inmunoterapias basadas en vacunas, teniendo en cuenta que son variadas las posibilidades de usos de vectores, especialmente virales, aptos para que se produzca una buena respuesta del animal afectado (Taylor & Haldorson, 2013).

Es así como se ha demostrado el uso del virus de la influenza atenuado, manipulado genéticamente con el propósito de usarlo en terapias basadas en vacunas. El Virus de la Influenza A (H3N2) contiene un genoma de ARN de cadena negativa segmentado; el segmento más corto codifica para dos proteínas virales no estructurales, en primer

lugar, la proteína no estructural 1 antagonista del IFN (NS1), y, en segundo lugar, la proteína de exportación nuclear (NEP). Cuando la inducción de IFN tipo I es bloqueada, la proteína NS1 evita que las células alcancen un estado antiviral; conociendo esto, las modificaciones genéticas en el ORF, eliminan la parte C-terminal de NS1, provocando una supresión de la función inhibidora del IFN de NS1 y, en consecuencia, la atenuación de los virus H3N2. De manera adicional, se ha demostrado que el ORF de NS1 tolera la inserción de secuencias extrañas de gran tamaño, muy útil para manipulaciones genéticas con fines terapéuticos. Además, NS1 se expresa en gran medida, fomentando una buena respuesta inmune frente a antígenos coexpresados. Otra ventaja es que los vectores recombinantes del Virus de la Influenza A con eliminación de NS1 no producen intermediarios del ADN durante su ciclo de vida, lo que impide la integración en el genoma huésped, confiriendo un nivel seguridad importante para su uso (Jindra *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

El uso de vectores virales como potenciales terapéuticos para combatir enfermedades se ha investigado a lo largo de los años y han tenido una gran acogida debido a la efectividad de los resultados obtenidos. Estos vectores, obtenidos de virus de plantas, han evolucionado de generación en generación y han sido aplicados incluso en tratamientos contra el cáncer, ya que actúan como nanopartículas que se aplican directamente en la lesión tumoral, y estimulan una respuesta inmune localizada, mediada por INF α , evidenciando un resultado positivo para el tratamiento de estas patologías. Si bien, estos vectores provenientes de virus de plantas no han sido estudiados como posibles tratamientos para la papilomatosis bovina y la sarcoidosis equina ocasionadas por el VPB, hacen falta estudios ya que pueden ser potenciales para mitigar las lesiones y los daños provocados por el mismo virus.

Para el manejo y regresión de tumores se ha utilizado vectores virales basados en el Virus de la Influenza A recombinante, modificado genéticamente para eliminar su proteína NS1, la cual actúa como un factor de virulencia que dificulta la respuesta antiviral mediada por interferón de tipo I (IFN) del huésped. Estos avances son prometedores para ser usados in vivo en tratamientos para la regresión de tumores provocados por el Virus del Papiloma Bovino y además para obtener vacunas estables dirigidas contra el mismo virus.

El avance tecnológico y farmacéutico sobre posibles tratamientos aplicados en bovinos que estimulen la regresión de tumores es pobre, principalmente porque la papilomatosis bovina en la mayoría de los casos demuestra una regresión espontánea, salvo ciertos casos especiales, y los animales infectados sobreviven sin que esto traiga repercusiones negativas para su desarrollo. Además, algunas terapias basadas en la producción recombinante de proteínas virales como la L2 y la E7, han demostrado cierto grado de utilidad, al inducir la regresión de lesiones causadas por el VPB. Así, como estos casos no se tornan clínicamente más severos, se utilizan técnicas y procedimientos más naturales y rudimentarios en estos ambientes.

REFERENCIAS

- Archana, S., Prasad, A., Davis, J., & Seena, T. (2019). Bovine papillomatosis and its treatment under farm condition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(4), 2880-2884.
- Bogaert, L., Van Poucke, M., De Baere, C., Dewulf, J., Peelman, L., Ducatelle, R., Gasthuys, F., & Martens, A. (2007). Bovine papillomavirus load and mRNA expression, cell proliferation and p53 expression in four clinical types of equine sarcoid. *The Journal of general virology*, 88(Pt 8), 2155–2161. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82876-0>
- Bolaños, A., Florez, G., Montealegre, N., Perdomo, D., Trujillo, J., Sanchez, L., & Silva, C. (2017). Eficacia terapéutica del clorobutanol (Verruex®) en el tratamiento de papilomatosis bovina. Estudio en cuatro predios en Caquetá, Colombia. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 18(10), 1-8.
- Bolaños, A., Florez, G., Montealegre, N., Perdomo, D., Trujillo, J., Sanchez, L., & Silva, C. (2017). Eficacia terapéutica del clorobutanol (Verruex®) en el tratamiento de papilomatosis bovina. Estudio en cuatro predios en Caquetá, Colombia. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 18(10), 1-8.
- Borzacchiello, G., & Roperto, F. (2008). Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Veterinary research*, 39(5), 45. <https://doi.org/10.1051/vetres:2008022>
- Campo M. S. (2002). Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus research*, 89(2), 249–261. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(02\)00193-4](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(02)00193-4)

- Campo, M. S., Grindlay, G. J., O'Neil, B. W., Chandrachud, L. M., McGarvie, G. M., & Jarrett, W. F. (1993). Prophylactic and therapeutic vaccination against a mucosal papillomavirus. *The Journal of general virology*, *74* (Pt 6), 945–953. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-6-945>
- Cardona-Álvarez, J., Montes-Vergara, D., & Álvarez-Peñate, J. (2018). Caracterización clínica, histopatológica e histoquímica del papiloma cutáneo en bovinos (*Bos Taurus*) del departamento de Córdoba, Colombia. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, *21*(1), 137-146.
- Carter, G. R., Wise, D. J., & Flores, E. F. (2004). A concise review of veterinary virology. International Veterinary Information Service.
- Chabeda, A., Yanez, R. J. R., Lamprecht, R., Meyers, A. E., Rybicki, E. P., & Hitzeroth, I. I. (2018). Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. *Papillomavirus research (Amsterdam, Netherlands)*, *5*, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2017.12.006>
- Chambers, G., Ellsmore, V. A., O'Brien, P. M., Reid, S. W. J., Love, S., Campo, M. S., & Nasir, L. (2003). Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *The Journal of general virology*, *84*(Pt 5), 1055–1062. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18947-0>
- Corteggio, A., Altamura, G., Roperto, F., & Borzacchiello, G. (2013). Bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in naturally occurring tumors: are two better than one?. *Infectious agents and cancer*, *8*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-8-1>
- DeMasi, J., Chao, M. C., Kumar, A. S., & Howley, P. M. (2007). Bovine papillomavirus E7 oncoprotein inhibits anoikis. *Journal of virology*, *81*(17), 9419–9425. <https://doi.org/10.1128/JVI.00422-07>
- Díaz, R. V., Duch, C. E., Gómez, A. D., Duato, E. G. L., & Rico, L. B. (2012). Papilomatosis bovina: epidemiología y diversidad de papilomavirus bovinos (BPV). *Revista complutense de ciencias veterinarias*, *6*(2), 38-58.
- Diniz, N., Melo, T. C., Santos, J. F., Mori, E., Brandão, P. E., Richtzenhain, L. J., Freitas, A. C., Beçak, W., Carvalho, R. F., & Stocco, R. C. (2009). Simultaneous presence of bovine papillomavirus in blood and in short-term lymphocyte cultures from dairy cattle in Pernambuco, Brazil. *Genetics and*

molecular research : *GMR*, 8(4), 1474–1480. <https://doi.org/10.4238/vol8-4gmr668>

- Frias-De-Diego, A., Jara, M., & Escobar, L. E. (2019). Papillomavirus in wildlife. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 406.
- Guzmán López, S., Barboza Quintana, O., & González Ramírez, R. A. (2010). Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico. *Medicina universitaria*, 12(49), 231-238.
- Hefferon K. (2017). Plant Virus Expression Vectors: A Powerhouse for Global Health. *Biomedicines*, 5(3), 44. <https://doi.org/10.3390/biomedicines5030044>
- Jarrett, W. F., Smith, K. T., O'Neil, B. W., Gaukroger, J. M., Chandrachud, L. M., Grindlay, G. J., McGarvie, G. M., & Campo, M. S. (1991). Studies on vaccination against papillomaviruses: prophylactic and therapeutic vaccination with recombinant structural proteins. *Virology*, 184(1), 33–42. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90819-w](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90819-w)
- Jindra, C., Hainisch, E. K., Rümmele, A., Wolschek, M., Muster, T., & Brandt, S. (2021). Influenza virus vector iNS1 expressing bovine papillomavirus 1 (BPV1) antigens efficiently induces tumour regression in equine sarcoid patients. *PloS one*, 16(11), e0260155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260155>
- Jindra, C., Huber, B., Shafti-Keramat, S., Wolschek, M., Ferko, B., Muster, T., Brandt, S., & Kimbauer, R. (2015). Correction: Attenuated Recombinant Influenza A Virus Expressing HPV16 E6 and E7 as a Novel Therapeutic Vaccine Approach. *PloS one*, 10(11), e0143269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143269>
- Knottenbelt D. C. (2019). The Equine Sarcoid: Why Are There so Many Treatment Options?. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, 35(2), 243–262. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2019.03.006>
- Knowles, G., O'Neil, B. W., & Campo, M. S. (1996). Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. *Journal of virology*, 70(12), 8451–8458. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.12.8451-8458.1996>
- Lancaster, W. D., Olson, C., & Meinke, W. (1977). Bovine papilloma virus: presence of virus-specific DNA sequences in naturally occurring equine

- tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(2), 524–528. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.524>
- Lin, K., Doolan, K., Hung, C. F., & Wu, T. C. (2010). Perspectives for preventive and therapeutic HPV vaccines. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, 109(1), 4–24. [https://doi.org/10.1016/s0929-6646\(10\)60017-4](https://doi.org/10.1016/s0929-6646(10)60017-4)
- Lunardi, M., Alfieri, A. A., Otonel, R. A. A., & Alfieri, A. F. (2013). Bovine Papillomaviruses—Taxonomy and Genetic. *Curr Issues Mol Virol Viral Genet Biotechnol Appl*, 113.
- Méndez Rodríguez, I. (2019). Tipificación viral y características inmunopatológicas de la fibropapilomatosis bovina en diferentes regiones de San Luis Potosí. Tesis de maestría, Universidad Autónoma San Luis de Potosí. Mexico.
- Munday J. S. (2014). Bovine and human papillomaviruses: a comparative review. *Veterinary pathology*, 51(6), 1063–1075. <https://doi.org/10.1177/0300985814537837>
- Namgyel, U., Wangdi, K., Pem, R., & Rinchen, S. (2021). Effectiveness of different treatment protocols against cutaneous bovine papillomatosis (wart): a clinical trial study. *Bhutan Journal of Animal Science*, 5(1), 95-102.
- Nasir, L., & Brandt, S. (2013). Papillomavirus associated diseases of the horse. *Veterinary microbiology*, 167(1-2), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.003>
- Nasir, L., & Campo, M. S. (2008). Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Veterinary dermatology*, 19(5), 243–254. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2008.00683.x>
- Orrego Uribe, A., González Garzón, G., Puerta, L. R., Báez, E. D., & Villafañe Arévalo, F. (1979). La papilomatosis faríngea bovina en Colombia. *Revista ACOVEZ*, 3(10), 8-14.
- Salman, T. (2016). Spontaneous tumor regression. *Journal of Oncological Science*, 2(1), 1–4. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jons.2016.04.008>
- Santos-López, G., Márquez-Domínguez, L., Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiz, V. (2015). Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano [General aspects of structure, classification and

replication of human papillomavirus]. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53 Suppl 2, S166–S171.

- Selvakumar, R., Borenstein, L. A., Lin, Y. L., Ahmed, R., & Wettstein, F. O. (1995). Immunization with nonstructural proteins E1 and E2 of cottontail rabbit papillomavirus stimulates regression of virus-induced papillomas. *Journal of virology*, 69(1), 602–605. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.1.602-605.1995>
- Shafti-Keramat, S., Schellenbacher, C., Handisurya, A., Christensen, N., Reininger, B., Brandt, S., & Kirnbauer, R. (2009). Bovine papillomavirus type 1 (BPV1) and BPV2 are closely related serotypes. *Virology*, 393(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.036>
- Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M., & Grinwis, G. C. (2013). Equine sarcoidosis: clinical signs, diagnosis, treatment and outcome of 22 cases. *Veterinary dermatology*, 24(1), 218–24.e48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01108.x>
- Sprayberry, K. A., & Robinson, N. E. (2014). *Robinson's current therapy in equine medicine*. Elsevier Health Sciences.
- Taylor, S., & Halderson, G. (2013). A review of equine sarcoid. *Equine Veterinary Education*, 25(4), 210-216.
- Ugochukwu, I. C. I., Aneke, C. I., Idoko, I. S., Sani, N. A., Amoche, A. J., Mshiela, W. P., ... & Sackey, A. K. B. (2019). Bovine papilloma: aetiology, pathology, immunology, disease status, diagnosis, control, prevention and treatment: a review. *Comparative Clinical Pathology*, 28, 737-745.
- Valencia, C. E., Payan, J., Appel, V. A., & Salazar, H. (2013). Valoración de la eficacia del cobre contra la papilomatosis bovina en el departamento del Cauca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(1), 218-224.
- Van Doorslaer, K., Li, Z., Xirasagar, S., Maes, P., Kaminsky, D., Liou, D., Sun, Q., Kaur, R., Huyen, Y., & McBride, A. A. (2017). The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database. *Nucleic acids research*, 45(D1), D499–D506. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw879>
- Villafañe Arévalo, F., Torres, J. A., Márquez, D. A., & Peña Beltrán, N. E. (1984). Papilomatosis faríngea bovina: estudio de epidemiología en el sur-oriente de

Santander. *Revista Acovez*, (26), 4-12.

Zeng, Z., Veitch, M., Kelly, G. A., Tuong, Z. K., Cruz, J. G., Frazer, I. H., & Wells, J. W. (2021). IFN- γ Critically Enables the Intratumoural Infiltration of CXCR3⁺ CD8⁺ T Cells to Drive Squamous Cell Carcinoma Regression. *Cancers*, 13(9), 2131

Malaria: un problema de salud publica

Natalia Michelle Collazos¹⁵

Ruth Mélida Sánchez¹⁶

Gabriela Arévalo Pinzón¹⁷

RESUMEN

La malaria es una infección causada por protozoarios del género *Plasmodium spp*, de los cuales existen seis especies que afectan al humano *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), *Plasmodium ovale wallikeri*, *P. ovale curtisi*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium knowlesi*, siendo *P. falciparum* y *P. vivax* las especies que reportaron en el 2020 más números de casos a nivel nacional con un 46,5% y 53,1% respectivamente (World Health Organization, 2019, 2020, 2021). Por lo tanto, realizar estudios e investigaciones en esta patología, permitirán aumentar el conocimiento de esta enfermedad, con el fin de proponer el desarrollo de vacunas, disminuir los casos y erradicar las especies que afectan al humano, entre ellas está el *P. falciparum*, que se ha reportado anualmente en zonas endémicas.

Así mismo, se ha descrito un aumento de casos de *P. vivax* siendo relevante en la región de las Américas, en donde causa el 75% de los casos de malaria. Una de las principales complicaciones para controlar la enfermedad causada por *P. vivax*, ha sido su estadio latente en el hígado denominado hipnozoito y la ausencia de síntomas en la etapa pre-eritrocítica de su ciclo biológico (Howes et al., 2016). En esta fase participan un alto número de proteínas, donde la proteína anónima relacionada con trombospondina (TRAP) es una de las más trabajadas e implicadas en los mecanismos de invasión del esporozoito (Sultan et al., 1997).

Por lo tanto, en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos que ataquen las formas parasitarias, en especial la del estadio esporozoito que implicaría el bloqueo del desarrollo de la enfermedad, se ha estudiado la proteína TRAP, un antígeno presente en las diferentes especies del género *Plasmodium* (Rogers et al., 1992). Basados en la importancia de esta enfermedad en las zonas

¹⁵ Estudiante de Bacteriología y Laboratorio clínico, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la Salud. ncollazos@unicolmayor.edu.co.

¹⁶ PhD en Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Docente Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la Salud. rmsanchezm@unicolmayor.edu.co.

¹⁷ Ph.D en Ciencias Biológicas Universidad del Rosario. Docente MS.c en Ciencias Biológicas. Docente Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la Salud. garevalop@unicolmayor.edu.co

tropicales y subtropicales del mundo, se llevó a cabo una revisión de la epidemiología actual, ciclo celular del parásito enfocado en las principales especies de *Plasmodium*. Seguido de esta información se hace énfasis en las características de la proteína TRAP y su relevancia en el ciclo de invasión a la célula hepática.

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad antigua que fue comprendida gracias a Alphonse Laveran en 1880, quien analizó sangre de personas que presentaban picos febriles y síntomas inusuales para la época, desencadenando una serie de investigaciones al respecto en donde fueron descubiertos los estadios parasitarios y la transmisión vectorial a mediados del año 1897 (Cox, 2010). Pese a esto, no se comprendía a profundidad el inicio y la evolución parasitaria, resolviéndose en 1948 cuando Henry Shortt y Cyril Garnham mostraron la fase de división del parásito en el hígado (Shortt & Garnham, 1948), lo cual fue un gran aporte científico para lograr comprender el ciclo de vida de *Plasmodium spp.* A medida que ha pasado el tiempo, la malaria, catalogada como enfermedad transmitida por vectores, ha sido foco de múltiples investigaciones que han llevado a la identificación de blancos terapéuticos para la generación de vacunas, con el fin de poder controlar esta enfermedad (Sato, 2021). Sin embargo, como se mostrará más adelante, el ciclo de vida de este parásito impone retos interesantes para el desarrollo de métodos efectivos.

Ahora bien, buscando una solución para controlar y erradicar la malaria se han realizado investigaciones, detectando blancos para bloquear la infección, siendo uno de los más prometedores la etapa pre-eritrocítica, en donde se ve implicado la forma infectiva parasitaria denominado: esporozoito (Frischknecht & Matuschewski, 2017). Esta fase es el estadio infectante del parásito que es inoculado durante la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles*. Una vez dentro del tejido o vaso sanguíneo humano, el esporozoito debe hacer un viaje hacia el tejido hepático (blanco), a través de un proceso denominado atravesamiento celular “cell traversal” (Menard et al., 2013). Durante este proceso se ha documentado que el parásito es capaz de atravesar distintas células humanas (epiteliales, células fenestradas, células de Kupffer) para acceder finalmente a hepatocitos con alta concentración de glicosaminoglicanos (Mota et al., 2001).

La invasión a la célula hepática implica por parte del esporozoito, el uso de un armamento proteico proveniente del complejo apical y de la membrana plasmática. Dentro de estos antígenos se ha descrito ampliamente la participación de la proteína circumsporozoito (CSP) y la proteína anónima relacionada a la trombospondina (TRAP) (Mota et al., 2001).

Esta revisión, presenta las generalidades de la malaria, partiendo de un contexto epidemiológico, ciclo de vida del parásito, manifestaciones clínicas de la infección y finaliza con la proteína TRAP y su importancia a nivel de la interacción en la infección del hepatocito.

METODOLOGIA

Diseño del estudio: La presente revisión de literatura tomó algunas fases del protocolo PRISMA (Salameh et al., 2019), se investigaron los objetivos para plantear limitaciones con el fin de crear la notación de indagación, hallando los artículos principales, subsiguientemente fueron filtrados, examinando para presentar la información encontrada.

Fase 1. Se trazaron y constituyeron los objetivos pertinentes, la pregunta de investigación que buscó responder ¿Cuál es el impacto en la salud pública de la malaria y su relación con la proteína TRAP que se une a células hepáticas?

Fase 2. Se buscaron artículos científicos en las bases de datos como ScienceDirect, Scopus, PubMed, Web of Science, Ebsco, Taylor and Francis y Scielo, utilizando las palabras clave y creando las fórmulas de indagación.

Fase 3. En total se obtuvieron 138 artículos, los cuales fueron examinados por título, resumen y contenido, tomando en cuenta los criterios de inclusión y exclusión. Como resultado de este proceso se escogieron aproximadamente 38 artículos para la construcción de la revisión, en caso de que el artículo no cumpliera los criterios de inclusión, se escogió uno de los artículos eliminados que poseía más citas.

Fase 4. Los artículos seleccionados se analizaron de una manera detallada para hallar información apreciable para desarrollar la revisión, haciendo énfasis en la malaria: un problema de salud pública y su relación con la proteína TRAP. Se utilizaron las palabras clave como “hepatic cells”, “malaria”, “pre-erythrocytic stage”, “thrombospondin-related anonymous protein A” . Se escogieron aproximadamente 38 referencias para dar inicio al proceso de revisión.

La calidad de los artículos seleccionados fue determinada por cada autor empleando la herramienta AXIS, la cual evalúa calidad de la certeza de los estudios y el peligro de sesgo en la elección. Se desarrolló con el uso indicador Delphi, que cuenta con cuatro módulos: introducción, métodos, resultados, discusión, con un total de aproximadamente 20 preguntas (Downes et al., 2016). Las condiciones de alta, moderada y baja calidad para cada uno de los artículos evaluados se dispusieron con los criterios: Si (cumple), No (no cumple), No medible (no detallado) y No aplica (N/A). Se determinó como calidad alta a los artículos con más de 15 puntos, calidad media 12-15 puntos y baja calidad a los artículos con menos de 12 puntos, solo se revisaron artículos de alta y media calidad.

El análisis cualitativo y procedencia de los datos Los artículos apartados fueron examinados y revisados por los autores para efectuar una recapitulación cualitativa; se extrajeron los datos: apellidos de los primeros autores, año y lugar del diseño del estudio.

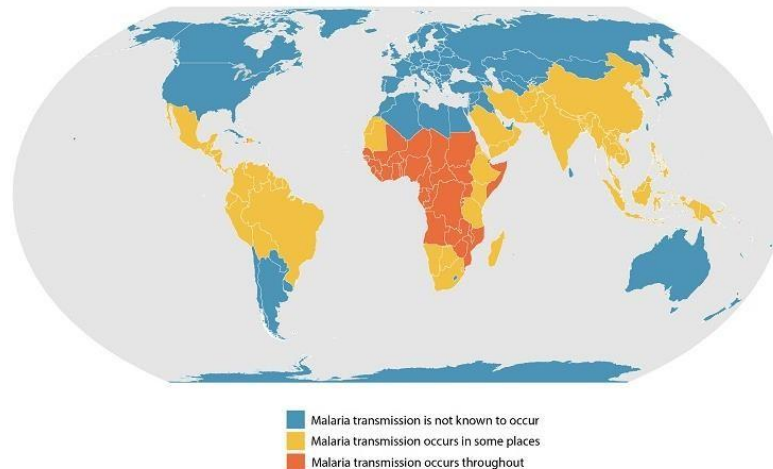
RESULTADOS Y DISCUSION

EPIDEMIOLOGÍA DE MALARIA NIVEL MUNDIAL

La malaria es una de las enfermedades transmitidas por vectores más ampliamente distribuida a nivel mundial que afecta principalmente zonas tropicales. En el año 2020 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó aproximadamente 241 millones de casos, encontrando un gran impacto en las regiones de África, Asia y Latinoamérica (World Health Organization, 2019, 2021)

El impacto en salud pública de esta enfermedad se da porque afecta tanto a niños, mujeres embarazadas y adultos mayores de 60 años, siendo niños menores de 5 años la mayoría de los casos registrados por la OMS en el 2019 con un porcentaje del 67%. *P. falciparum* es el parásito más reportado, representando el 99,7% en la Región Africana, 50% en la región de Asia Sudoriental y un 65% en la Región Pacífica Occidental. De igual importancia se reporta a *P. vivax* en la Región de Asia Sudoriental en un 53% y predominando en un 75% en la Región Americana según la OMS, encontrando a Venezuela, Brasil y Colombia como los países más afectados (World Health Organization, 2020).

Figura 1. Malaria a nivel mundial. Este mapa muestra una aproximación de las partes del mundo donde ocurre la transmisión de la malaria



Fuente: tomado del Center of Disease Control and Prevention (CDC)
<https://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>.

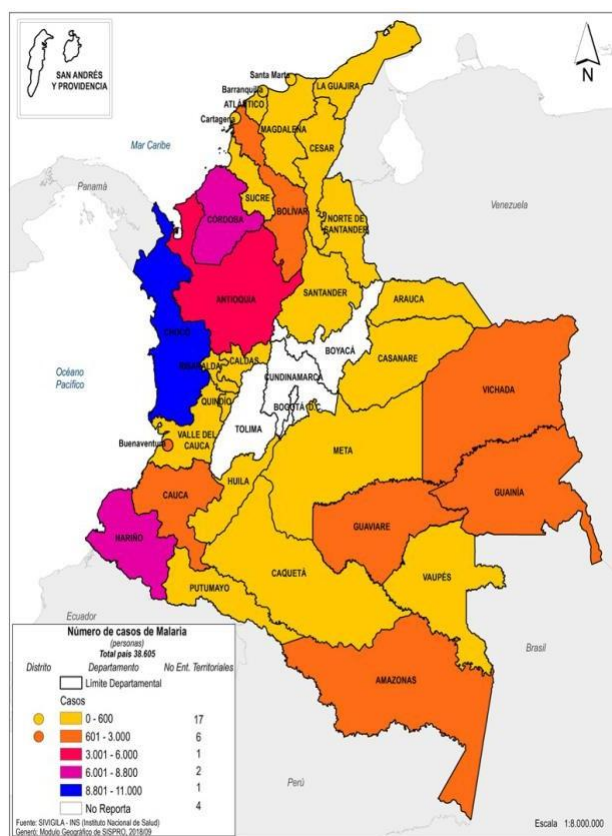
Pese a los avances y a la disminución de la tasa de incidencia a nivel mundial, la malaria continúa siendo un problema difícil de controlar y provocando en el año 2020, 627 mil muertes reportadas por la OMS, de las cuales la mayoría de casos son presentados en niños menores de 5 años, siendo el grupo poblacional más afectado, reportando un 67% de muertes (World Health Organization, 2020).

EPIDEMIOLOGÍA DE MALARIA EN COLOMBIA

En Colombia se registran aproximadamente 50.000 a 100.000 casos anualmente, convirtiéndose en una enfermedad que conlleva a un problema de salud pública, siendo predominante la especie de *P. vivax* en un 60 - 65% en el país. La región del Pacífico ha sido el foco de transmisión de malaria presentando los departamentos del Chocó, Cauca, Nariño y distrito de Buenaventura un porcentaje del 50 al 60% de infección, seguidos de la Región de Urabá con los departamentos de Antioquia y Nariño con un 20 - 30%, continuando con la región de la Amazonia con un 5 a 10% de casos registrados a nivel nacional (Ministerio de Protección Social, 2021).

Así mismo, de Colombia, el Instituto Nacional de Salud (INS) reportó en el año 2020, 76.958 casos donde los departamentos más afectados fueron Antioquía, Córdoba, Bolívar y las zonas fronterizas (Ministerio de Protección Social, 2021) (Instituto Nacional de Salud, 2019) (Figura 2).

Figura 2. Número de casos de malaria registrados en el 2019 en Colombia. Número de casos reportados en Colombia en el año 2019. (Blanco) No se han reportado casos. (Amarillo) Se han presentado de 0 a 600 casos. (Naranja) Reporte de 601 a 3.000 casos. (Rojo) Reporte de 3.001 a 6.000 casos. (Lila) Reporte de 6.001 a 8.800 casos. (Azul) Reporte de 8.801 a 11.000 casos de malaria en el 2019



Fuente: Tomado de (Instituto Nacional de Salud, 2019).

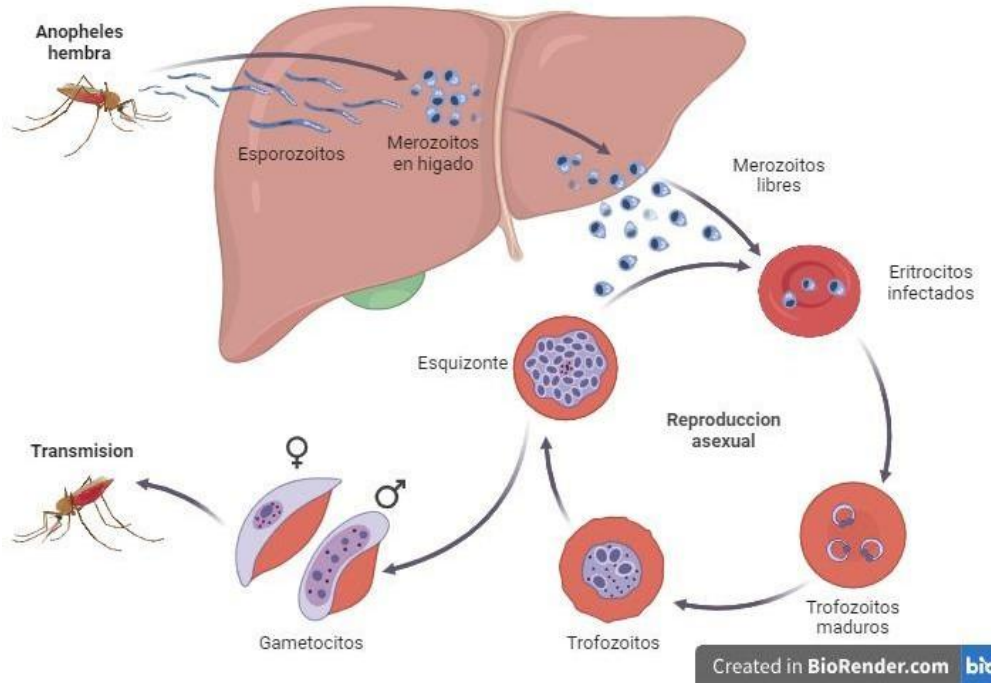
CICLO BIOLÓGICO DE *PLASMODIUM SPP*

El ciclo de vida de la malaria inicia con la inoculación de los esporozoitos provenientes de las glándulas salivales del mosquito hembra *Anopheles*, los cuales inician la fase hepática. Allí los esporozoitos viajan al hígado mediante un mecanismo de atravesamiento celular, que les permiten alcanzar las células hepáticas (Menard et al., 2013). Un alto número de proteínas del parásito son expresadas para interactuar con la membrana de la célula hepática (Dundas et al., 2019). Una vez dentro de la célula hepática, estos parásitos continúan su ciclo de vida madurando en su segundo estadio llamado esquizonte hepático en donde la mayoría de las especies de *Plasmodium* toman alrededor de 5-7 días este proceso replicativo (Figura 3).

El esquizonte hepático se fragmenta para liberar entre 10.000 y 30.000 de merozoitos que invadirán eritrocitos humanos iniciando así la fase eritrocítica. El parásito en este estadio se desarrolla en varias fases intraeritrocíticas denominadas, anillo, trofozoito y finalmente esquizonte, el cual dará origen a nuevos merozoitos, en un tiempo aproximado de 48 a 72 horas dependiendo de la especie parasitaria. El esquizonte sanguíneo se rompe y los merozoitos expuestos saldrán a invadir nuevas células rojas. Esta lisis celular es la responsable de toda la sintomatología clínica de la enfermedad. Ocasionalmente algunos merozoitos pueden convertirse en células sexuales llamados microgametocitos (femenino) y macrogametocitos (masculino). Cuando estos estadios sexuales son ingeridos por otro mosquito, en su estómago se desarrollan estadios como ooquinate que invaden la pared del intestino convirtiéndose en ooquistes que crecen, se rompen y se liberan los esporozoitos hacia la proboscis del artrópodo (Mueller et al., 2009).

Es importante destacar, que el estadio hepático donde participa el esporozoito es considerado un objetivo atractivo para el desarrollo de vacunas y medicamentos. Esto es en primer lugar, debido a que esta forma parasitaria se encuentra expuesta a los anticuerpos del hospedero durante varios minutos; en segundo lugar, es considerada la etapa que genera un cuello de botella en el ciclo de vida del parásito, con solo alrededor de 10 a 100 esporozoitos transmitidos por la picadura de un mosquito infectado y finalmente es una etapa asintomática, por lo que bloquear esta fase podría prevenir el avance hacia la enfermedad clínica.

Figura 3. Ciclo vida de Plasmodium spp en el humano. En el humano se encuentran dos estadios de infección: el estadio intrahepático donde participa el esporozoito y el estadio eritrocítico donde encontramos al merozoito. *P. vivax* a diferencia de otros parásitos de la malaria, infecta preferencialmente reticulocitos humanos. El hipnozoito es un estadio latente en el tejido hepático que aparece únicamente en *P. vivax* y *P. ovale*.



Fuente: Creación propia en BioRender.

PATOGENESIS

La evolución de la malaria es la transición imperturbable entre el mosquito al humano y viceversa. Sin embargo, el impacto se evidencia a nivel individual, comunitario, nacional y mundial.

PLASMODIUM FALCIPARUM

La biología de *P. falciparum* medida *in vitro* es predecible y fácilmente interrumpida, ya que su ciclo biológico intraeritrocítico tarda aproximadamente 48 horas (Bozdech et al., 2003). Este parásito pasa por más de 10 estados morfológicos, infectando aproximadamente 10.000 células para realizar su replicación (Dixon et al., 2012) (Mohandas & An, 2012).

Se ha descrito que este parásito utiliza aproximadamente 6000 genes para realiza todo el ciclo de vida, expresando diferentes proteínas para realizar los procesos de invasión en cada etapa infectiva. Sin embargo, la mayoría de estos genes no tiene una función conocida (Milner, 2018).

La enfermedad clínica humana es, por lo tanto, el resultado de la interacción de la biología del parásito en concierto con la respuesta fisiopatológica humana. Las advertencias que agregan variación a esta interacción hospedero-parásito incluyen la diversidad genética del parásito de proteínas clave, coinfecciones, comorbilidades, retrasos en el tratamiento, polimorfismos humanos y determinantes ambientales. El resultado final de la enfermedad clínica incluye un espectro de fiebre, anemia y coma, entre muchos otros (Oakley et al., 2011).

Particularmente *P. falciparum* modifica la superficie del glóbulo rojo infectado y crea un fenotipo adhesivo, que elimina el parásito de la circulación durante casi la mitad del ciclo de vida asexual, un período de tiempo único entre los parásitos de la malaria. La unión de los eritrocitos infectados puede ocurrir con endotelio, plaquetas o glóbulos rojos no infectados (Fairhurst & Wellems, 2006).

El parásito logra este estado cito-adherente a través de la proteína 1 de membrana de eritrocitos de *P. falciparum* (PfEMP1), que es el producto de la transcripción del gen *var*. Se ha descrito que una cepa de parásito *P. falciparum* puede contener hasta 60 copias del gen *var*, cada una muy variable y diferente a las demás. Estos genes son algunos de los más diversos dentro del genoma del parásito y dentro de la población total de parásitos. Su expresión está impulsada por varios mecanismos, incluida la presión de selección inmunitaria y la epigenética. Este aspecto de la biología de los parásitos (expresión del gen *var*) ocurre en todas las infecciones, incluida la malaria asintomática y sin complicaciones (Smith, 2014).

Independientemente de la variabilidad de la enfermedad, el secuestro (eliminación temporal del parásito de la circulación a través de la unión a la superficie de los glóbulos rojos) de *Pf* ocurre durante cada infección humana durante la mitad del ciclo de vida asexual. Por lo tanto, en una infección de bajo nivel en la que una sola picadura de mosquito ha introducido una sola camada de parásitos sincrónicos, los pacientes pueden mostrar frotis de sangre periférica negativos.

Todo esto puede ser especialmente cierto en los viajeros o residentes de regiones de baja endemicidad. Sin embargo, en entornos altamente endémicos, los pacientes son mordidos repetidamente y pueden presentar fiebre continua y un frotis de sangre siempre positivo durante las primeras décadas de vida. A medida que evoluciona una inmunidad local a la población de *P. falciparum* en un hospedero determinado, los frotis pueden caer nuevamente a niveles muy bajos e incluso volverse indetectables a pesar de la transmisión continua (Smith et al., 2015).

PLASMODIUM VIVAX

P. vivax es el parásito de la malaria que más comúnmente causa enfermedad clínica fuera de África. A diferencia de *P. falciparum*, pero como todos los demás parásitos de la malaria humana, *P. vivax* no muestra un período prolongado de secuestro durante la infección. Por lo tanto, el parásito a lo mejor esté más frecuentemente expuesto a la eliminación por el bazo y se observe con más frecuencia en un frotis de sangre periférica durante una infección. Una de las características únicas de *P. vivax* es la preferencia de los glóbulos rojos por los reticulocitos y el uso predominante del antígeno Duffy para la invasión, aunque no en forma absoluta (Moreno-Pérez et al., 2013).

Esto conduce a una infección clínica con un nivel más bajo de parasitemia que el observado en *P. falciparum*. Debido a que los reticulocitos son más grandes que los glóbulos rojos maduros, las células infectadas parecen más grandes que las células que las rodean en el frotis de sangre periférica. Los puntos característicos de Schuffner, que son estructuras de caveolas y vesículas, se ven tanto en *P. vivax* como en *P. ovale*. La forma diagnóstica de *P. vivax* es la forma ameboidea en la que el citoplasma, exclusivo de *P. vivax*, tiene proyecciones en forma de dedos sin una estructura típica redonda u ovalada (Bourgard et al., 2018) (Mueller et al., 2009).

Clínicamente, los pacientes se presentan de manera casi idéntica a otras infecciones de malaria con fiebre, más una constelación de otros síntomas posibles. A diferencia de *P. falciparum* y *P. malariae* (que tienen una sola ruptura del esquizonte hepático incluso poco después de la invasión de esporozoitos), *P. vivax* y pueden "resurgir" cuando los hipnozoitos (formas inactivas que duran meses o años en el hígado por una sola exposición a esporozoitos) liberan merozoitos. Por lo tanto, el momento clínico de una enfermedad (muchos meses o años después de la exposición) podría ser una pista para uno de estos organismos (Milner, 2018; Mueller et al., 2009).

INVASIÓN DEL HEPATOCITO

Los esporozoitos maduros de *Plasmodium spp* miden aproximadamente 10µm de largo y menos de 1µm de grosor y presentan una curvatura ligera. En su interior, poseen organelos característicos de una célula eucariota anexando orgánulos reconocidos del phylum *Apicomplexa* como lo son el apicoplasto y el complejo apical, este último está conformado por gránulos densos, rhoptrias y micronemas; confiriendo al parásito un mecanismo de invasión sofisticado basado en secreción de proteínas, lo cual ayuda al parásito en su adhesión a la célula hepática, motilidad y el desarrollo de la vacuola parasitófora (Ejigiri & Sinnis, 2009; Kori et al., 2018).

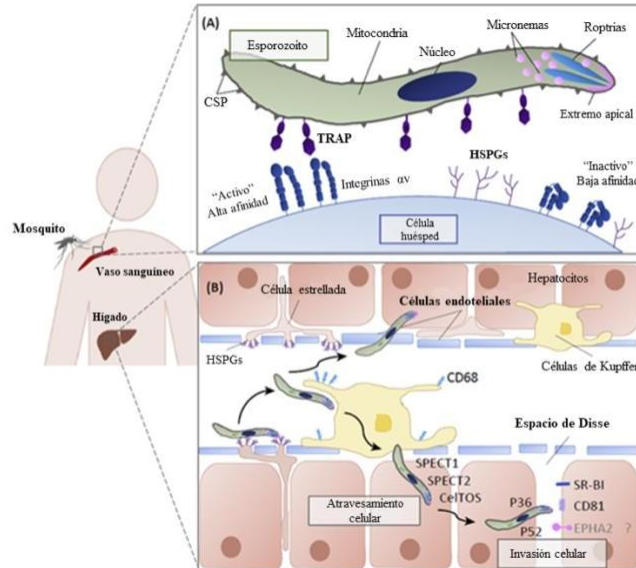
Los esporozoitos realizan una migración y atravesamiento celular que está dirigido por algunas proteínas, las cuales hacen parte del complejo apical (Mota et al., 2001). Estas proteínas son expresadas con base en la necesidad que el parásito las requiera. Algunas proteínas son encargadas de abrir poros y así además logran invadir ganglios linfáticos, capilares sanguíneos

e incluso permanecer en la dermis. Sin embargo, es vital para el parásito establecerse en las células hepáticas para continuar su desarrollo y evolución (De Niz et al., 2017).

Una vez los esporozoitos llegan al hígado, se encuentran con las células de Kupffer que logran evadir con ayuda de algunas proteínas como SPECT1, SPECT2, proteína similar a la perforina (PLP) y CelTOS (Mota et al., 2001). Estos migran por medio de su locomoción que es impulsado por un motor de actina – miosina para finalmente encontrar las células hepáticas.

Los hepatocitos, están recubiertos por heparán sulfato y sin número de receptores que ayudan a la célula a comunicarse con otras e interactuar con el exterior. No obstante, los esporozoitos al estar cerca de la célula hepática inmediatamente expresan en su membrana la proteína circumsporozoito (CSP) que se conjuga con el receptor que utiliza el VHB, también se expresa proteína TRAP, la cual aún no se ha identificado específicamente que receptor utiliza para darle entrada al parásito, pero le confiere la adhesión necesaria para realizar la invasión de la célula. (Acharya et al., 2017; Amino et al., 2008) Es allí en donde obtiene un ambiente benéfico para continuar desarrollándose y continuar con su recorrido de infección en el hospedero.

Figura 4. Atravesamiento celular del esporozoito: (A) Morfología y proteínas expresadas en la membrana parasitaria y su interacción con receptores de la célula blanco. (B) Atravesamiento del esporozoito para realizar la invasión a las células hepáticas.



Fuente: Tomado y modificado al español de (Dundas et al., 2019).

PROTEÍNA TRAP EN PARÁSITOS DE LA MALARIA

Una de las proteínas involucradas en el proceso de adhesión e invasión es la proteína anónima relacionada a la trombospondina -TRAP, la cual se expresa en las micronemas de los

esporozoitos y es traslocada hacia la superficie del parásito (Muller et al., 1993) donde se ha visto involucrada en procesos de adhesión y motilidad (Sultan et al., 1997).

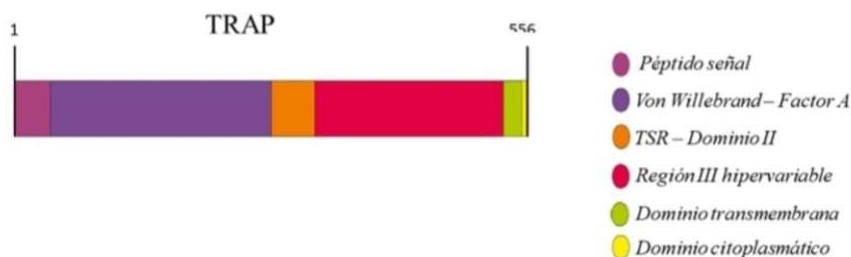
Esta molécula, ha sido estudiada en las especies que han desarrollado mayor impacto en cuanto a su alta mortalidad. En el año 2004 se estudió la estructura y funcionalidad de los dominios de TRAP en *P. falciparum* (PfTRAP), en donde produjeron proteínas recombinantes expresadas en bacterias y baculovirus, para posteriormente ser purificados y filtrados mostrando adhesión a células hepáticas-HepG2 (Akhouri et al., 2004). Sin embargo, su capacidad de inhibición fue poco estudiada. Sin embargo, se logró demostrar que PfTRAP interactuaba con múltiples receptores durante el proceso de invasión de hepatocitos (Akhouri et al., 2004).

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE TRAP

La proteína TRAP, tiene un amplio rango de investigación a nivel molecular y ha sido involucrada en un amplio rango de funciones como motilidad parasitaria, atravesamiento e interacción específica con el hepatocito convirtiéndola en un blanco prometedor para la creación de vacunas contra la malaria. Varios grupos de investigación en los últimos años han realizado diferentes modelos experimentales para lograr obtener información sobre esta proteína. Uno de ellos fue en el año 2012, dónde analizaron los dominios y la conformación proteica de TRAP, lo que resultó en su implicación en motilidad de deslizamiento en los esporozoitos (Song et al., 2012).

TRAP contiene dos dominios denominados Factor A similar al Von Willebrand y el dominio trombospondina-TSR, los cuales han sido también identificados en otras proteínas de mamíferos tales como integrinas y factores del complemento y participan en interacciones extracelulares (figura 5).

Figura 5. Estructura primaria de la proteína TRAP. Se muestran cada una de las regiones de la proteína TRAP incluyendo el péptido señal y dominios correspondientes



Fuente: elaboración propia.

La proteína TRAP está ubicada en la membrana citoplasmática del esporozoito y al momento de la invasión e identificación celular esta se transloca para lograr la interacción con el receptor en la membrana del hepatocito (Malpede & Tolia, 2014).

Recientemente se encontró que la proteína *Pf*TRAP es capaz de interactuar a través del dominio A con la integrina $\alpha\beta 3$, lo cual muestra la versatilidad de interacción de la proteína *Pf*TRAP con la célula hospedera (Dundas et al., 2018; Templeton & Kaslow, 1997).

La proteína TRAP, ha sido también identificada en otras especies de *Plasmodium* como *Plasmodium gallinaceum* (*P. gallinaceum*), *P. knowlesi*, *Plasmodium* (Sultan et al., 1997). Estudios en parásitos roedores como *P. berguei* mostraron que *Pb*TRAP es esencial para la locomoción deslizante y el proceso de invasión a la célula hepática sugiriendo mecanismos conservados de esta proteína en las distintas especies parasitarias (Sultan et al., 1997).

En *P. vivax*, la segunda especie más relevante que afecta el ser humano se ha encontrado que la proteína *Pv*TRAP interactúa a través de su ectodominio con heparán sulfato, sin embargo, hasta el momento no se conocen las regiones mínimas de interacción que pueden estar participando específicamente en la unión con la célula hospedera (Nazeri et al., 2018). Previos estudios en otras proteínas de malaria se han enfocado en la identificación de las regiones mínimas de interacción específicas en busca de blancos terapéuticos contra la malaria (Molina-Franky et al., 2020). Estas pequeñas regiones han sido denominadas péptidos con alta capacidad de unión a la célula o HABPs y han sido identificados a través de una metodología altamente robusta, sensible y específica (Curtidor et al., 2015).

TRAP EN EL CICLO DE INVASIÓN DE LOS HEPATOCITOS

En el año 2009, se realizó un estudio en dónde asociaban a TRAP con la motilidad y un enlace transmembrana entre el citoesqueleto del parásito interactuando con la célula hospedera, uniéndose a la actina a través de su cola citoplasmática, concluyendo que TRAP es una proteína esencial que necesitan todos los Apicomplexa para proporcionar movilidad a los esporozoitos y llevar a cabo la invasión de los hepatocitos, también define una familia de proteínas que son conservadas a lo largo del ciclo malárico (Combe et al., 2009).

Ensayos de unión celular y mutagénesis han sido dirigidos a dos dominios adhesivos responsables del reconocimiento y la invasión de *P. falciparum* a las células hospederas, demostrando que se logran conservar estos dominios y que la mayoría de los Apicomplexa contienen estos dominios en TRAP (Pihlajamaa et al., 2013). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones a lo largo del tiempo se han realizado en *P. falciparum* dejando de lado la probabilidad de analizar esta proteína de gran importancia en otras especies que también causan la malaria en humanos. De esta forma, en el año 2018 se hicieron ensayos de inmunización en ratones combinando la proteína *Pv*TRAP y *Pv*CSP, encontrando inmunidad frente a malaria

con la combinación de los dos antígenos con respecto a los niveles proporcionados por vacunas individuales (Atcheson et al., 2018).

En el año 2017 Nazeri et al., realizó estudios de antigenicidad, donde se detectó que cerca del 40% de las personas evaluadas presentaron anticuerpos de tipo IgG anti-TRAP producidos durante infección natural. Un análisis del isotipo IgG reveló principalmente la presencia de IgG3 e IgG1, la cual no se correlaciono con la edad de los pacientes. De forma interesante la presencia de anticuerpos IgG1 e IgG3 con alta e intermedia avidéz fue mayor al 60%, mostrando la relevancia de estos anticuerpos en la eliminación de los esporozoitos (Nazeri et al., 2018).

Pese a los esfuerzos que se han hecho para estudiar a *P. vivax*, aún no se cuentan con las regiones necesarias de la proteína TRAP para ser incluidas en una vacuna contra esta especie parasitaria, por lo que las investigaciones deben ser dirigidas a describir más antígenos de la fase pre-eritrocítica y a delimitar mucho mejor las regiones claves de la proteína PvTRAP.

CONCLUSION

La malaria es considerada una infección relevante a nivel mundial, por ende, es un blanco de estudio para prevenir su transmisibilidad y la cronicidad en las personas que la padecen.

La proteína anónima relacionada con la trombospondina (TRAP) es un antígeno expresado en el esporozoito y ampliamente caracterizado en especies como *P. falciparum*. Sin embargo, en *P. vivax* se desconocen aún las regiones claves de interacción entre la proteína y la membrana de las células hepáticas.

REFERENCIAS

- Acharya, P., Garg, M., Kumar, P., Munjal, A., & Raja, K. D. (2017). Host–Parasite Interactions in Human Malaria: Clinical Implications of Basic Research [Review]. 8(889). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00889>
- Akhouri, R. R., Bhattacharyya, A., Pattnaik, P., Malhotra, P., & Sharma, A. (2004). Structural and functional dissection of the adhesive domains of Plasmodium falciparum thrombospondin-related anonymous protein (TRAP). *Biochem J*, 379(Pt 3), 815-822. <https://doi.org/10.1042/BJ20031500>
- Amino, R., Giovannini, D., Thiberge, S., Gueirard, P., Boisson, B., Dubremetz, J.-F., . . . Ménard, R. (2008). Host Cell Traversal Is Important for Progression of the Malaria Parasite through the Dermis to the Liver. *Cell Host & Microbe*, 3(2), 88-96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.12.007>

- Atcheson, E., Bauza, K., Salman, A. M., Alves, E., Blight, J., Viveros-Sandoval, M. E., . . . Reyes-Sandoval, A. (2018). Tailoring a Plasmodium vivax Vaccine To Enhance Efficacy through a Combination of a CSP Virus-Like Particle and TRAP Viral Vectors. *Infect Immun*, 86(9). <https://doi.org/10.1128/IAI.00114-18>
- Bourgard, C., Albrecht, L., Kayano, A., Sunnerhagen, P., & Costa, F. T. M. (2018). Plasmodium vivax Biology: Insights Provided by Genomics, Transcriptomics and Proteomics. *Front Cell Infect Microbiol*, 8, 34. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00034>
- Bozdech, Z., Llinás, M., Pulliam, B. L., Wong, E. D., Zhu, J., & DeRisi, J. L. (2003). The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of Plasmodium falciparum. *PLoS Biol*, 1(1), E5. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000005>
- Combe, A., Moreira, C., Ackerman, S., Thiberge, S., Templeton, T. J., & Menard, R. (2009). TREP, a novel protein necessary for gliding motility of the malaria sporozoite. *Int J Parasitol*, 39(4), 489-496. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.10.004>
- Cox, F. E. (2010). History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors*, 3(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-5>
- Curtidor, H., Patarroyo, M. E., & Patarroyo, M. A. (2015). Recent advances in the development of a chemically synthesised anti-malarial vaccine. *Expert Opin Biol Ther*, 15(11), 1567-1581. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1075505>
- De Niz, M., Burda, P.-C., Kaiser, G., del Portillo, H. A., Spielmann, T., Frischknecht, F., & Heussler, V. T. (2017). Progress in imaging methods: insights gained into Plasmodium biology. *Nature Reviews Microbiology*, 15(1), 37-54. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.158>
- Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., . . . Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 485(7398), 376-380. <https://doi.org/10.1038/nature11082>
- Downes, M. J., Brennan, M. L., Williams, H. C., & Dean, R. S. (2016). Development of a critical appraisal tool to assess the quality of cross-sectional studies (AXIS). *BMJ Open*, 6(12), e011458. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-011458>
- Dundas, K., Shears, M. J., Sinnis, P., & Wright, G. J. (2019). Important Extracellular Interactions between Plasmodium Sporozoites and Host Cells Required for Infection. *Trends Parasitol*, 35(2), 129-139. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.008>

- Dundas, K., Shears, M. J., Sun, Y., Hopp, C. S., Crosnier, C., Metcalf, T., . . . Wright, G. J. (2018). Alpha-v-containing integrins are host receptors for the Plasmodium falciparum sporozoite surface protein, TRAP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(17), 4477-4482. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719660115>
- Ejigiri, I., & Sinnis, P. (2009). Plasmodium sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Curr Opin Microbiol*, 12(4), 401-407. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.06.006>
- Fairhurst, R. M., & Wellems, T. E. (2006). Modulation of malaria virulence by determinants of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1 display. *Current Opinion in Hematology*, 13(3). https://journals.lww.com/co-hematology/Fulltext/2006/05000/Modulation_of_malaria_virulence_by_determinants_of.3.aspx
- Frischknecht, F., & Matuschewski, K. (2017). Plasmodium Sporozoite Biology. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025478>
- Howes, R. E., Battle, K. E., Mendis, K. N., Smith, D. L., Cibulskis, R. E., Baird, J. K., & Hay, S. I. (2016). Global Epidemiology of Plasmodium vivax. *Am J Trop Med Hyg*, 95(6 Suppl), 15-34. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0141>
- Instituto Nacional de Salud. (2019). Malaria en Colombia. <https://temas.sld.cu/vigilanciaensalud/2019/02/08/malaria-en-colombia-23/>
- Kori, L., Valecha, N., & Anvikar, A. (2018). Insights into the early liver stage biology of Plasmodium [Review Article]. 55(1), 9-13. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.234631>
- Malpede, B. M., & Tolia, N. H. (2014). Malaria adhesins: structure and function. *Cell Microbiol*, 16(5), 621-631. <https://doi.org/10.1111/cmi.12276>
- Menard, R., Tavares, J., Cockburn, I., Markus, M., Zavala, F., & Amino, R. (2013). Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nat Rev Microbiol*, 11(10), 701-712. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3111>
- Milner, D. A., Jr. (2018). Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025569>
- Ministerio de Protección Social. (2021). Colombia avanza en meta de eliminación de la malaria a 2030. <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Colombia-avanza-en-meta-de-eliminacion-de-la-malaria-a-2030.aspx#:~:text=%22Seg%C3%BAn%20reporte%20del%20Instituto%20Nacional,nuestro%20pa%C3%ADs%20son%20muy%20particulares.>
- Mohandas, N., & An, X. (2012). Malaria and human red blood cells. *Med Microbiol Immunol*, 201(4), 593-598. <https://doi.org/10.1007/s00430-012-0272-z>

- Molina-Franky, J., Cuy-Chaparro, L., Camargo, A., Reyes, C., Gomez, M., Salamanca, D. R., . . . Patarroyo, M. E. (2020). Plasmodium falciparum pre-erythrocytic stage vaccine development. *Malar J*, *19*(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-3141-z>
- Moreno-Pérez, D. A., Ruíz, J. A., & Patarroyo, M. A. (2013). Reticulocytes: Plasmodium vivax target cells. *105*(6), 251-260. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/boc.201200093>
- Mota, M. M., Pradel, G., Vanderberg, J. P., Hafalla, J. C., Frevert, U., Nussenzweig, R. S., . . . Rodríguez, A. (2001). Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science*, *291*(5501), 141-144. <https://doi.org/10.1126/science.291.5501.141>
- Mueller, I., Galinski, M. R., Baird, J. K., Carlton, J. M., Kochar, D. K., Alonso, P. L., & del Portillo, H. A. (2009). Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*, *9*(9), 555-566. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X)
- Muller, H. M., Reckmann, I., Hollingdale, M. R., Bujard, H., Robson, K. J., & Crisanti, A. (1993). Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of Plasmodium falciparum binds specifically to sulfated glycoconjugates and to HepG2 hepatoma cells suggesting a role for this molecule in sporozoite invasion of hepatocytes. *EMBO J*, *12*(7), 2881-2889. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05950.x>
- Nazeri, S., Zakeri, S., Mehrizi, A. A., Djajid, N. D., Snounou, G., Andolina, C., & Nosten, F. (2018). Vaccine adjuvants CpG (oligodeoxynucleotides ODNs), MPL (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A) and naloxone-enhanced Th1 immune response to the Plasmodium vivax recombinant thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) in mice. *Med Microbiol Immunol*, *207*(5-6), 271-286. <https://doi.org/10.1007/s00430-018-0545-2>
- Oakley, M. S., Gerald, N., McCutchan, T. F., Aravind, L., & Kumar, S. (2011). Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends Parasitol*, *27*(10), 442-449. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.06.004>
- Pihlajamaa, T., Kajander, T., Knuuti, J., Horkka, K., Sharma, A., & Permi, P. (2013). Structure of Plasmodium falciparum TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) A domain highlights distinct features in apicomplexan von Willebrand factor A homologues. *Biochem J*, *450*(3), 469-476. <https://doi.org/10.1042/BJ20121058>
- Rogers, W. O., Malik, A., Mellouk, S., Nakamura, K., Rogers, M. D., Szarfman, A., . . . Hoffman, S. L. (1992). Characterization of Plasmodium falciparum sporozoite

- surface protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(19), 9176-9180.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.19.9176>
- Salameh, J. P., McInnes, M. D. F., Moher, D., Thombs, B. D., McGrath, T. A., Frank, R., . . . Bossuyt, P. M. (2019). Completeness of Reporting of Systematic Reviews of Diagnostic Test Accuracy Based on the PRISMA-DTA Reporting Guideline. *Clin Chem*, 65(2), 291-301.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.292987>
- Sato, S. (2021). Correction to: Plasmodium-a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *J Physiol Anthropol*, 40(1), 3.
<https://doi.org/10.1186/s40101-021-00254-0>
- Shortt, H. E., & Garnham, P. C. (1948). Pre-erythrocytic stage in mammalian malaria parasites. *Nature*, 161(4082), 126. <https://doi.org/10.1038/161126a0>
- Smith, C. D., Piasecki, C. C., Weera, M., Olszewicz, J., & Lonstein, J. S. (2015). Correction to Smith et al. (2013). *Behav Neurosci*, 129(4), 411.
<https://doi.org/10.1037/bne0000086>
- Smith, J. D. (2014). The role of PfEMP1 adhesion domain classification in Plasmodium falciparum pathogenesis research. *Mol Biochem Parasitol*, 195(2), 82-87.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.07.006>
- Song, G., Koksak, A. C., Lu, C., & Springer, T. A. (2012). Shape change in the receptor for gliding motility in Plasmodium sporozoites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(52), 21420-21425. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218581109>
- Sultan, A. A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K. J., Crisanti, A., Nussenzweig, V., . . . Ménard, R. J. C. (1997). TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of Plasmodium sporozoites. 90(3), 511-522.
- Templeton, T. J., & Kaslow, D. C. (1997). Cloning and cross-species comparison of the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) gene from Plasmodium knowlesi, Plasmodium vivax and Plasmodium gallinaceum.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9041517/>
- World Health Organization. (2019). World malaria report 2019.
- World Health Organization. (2020). *World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges*.
- World Health Organization. (2021). *Informe mundial de malaria 2021*.
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240040496>

Mieloperoxidasa, biosíntesis y acción contra microorganismos y relación con enfermedades inflamatorias

María Paula Montoya E.¹⁸
Gloria Julieth Rincón G.¹⁹
Gladys Pinilla B.²⁰
Jeannette Navarrete O.²¹
Claudia A. Cruz B²²

RESUMEN

La inmunidad innata o natural, es la primera respuesta del sistema inmunitario contra diferentes agentes invasores externos, como bacterias, hongos, parásitos o virus; se compone de barreras, como la piel, membranas mucosas, lágrimas y ácido del estómago, también, de células como macrófagos, células dendríticas, polimorfonucleares (PMN) y células asesinas naturales (NK). Siendo los neutrófilos las células sanguíneas que realizan la fagocitosis y eliminación de microbios, el mecanismo es posible por tres tipos de gránulos, los azurófilos (primarios) los cuales contienen mieloperoxidasa (MPO); los específicos (secundarios) que contienen lactoferrina y gelatinasas; y los terciarios con metaloproteinasa 9 (MMP 9). La MPO después de la desgranulación se conjuga en el fagosoma con peróxido de hidrógeno (H₂O₂), lo que da como resultado una sustancia tóxica para los microorganismos fagocitados. Igualmente, la MPO se ha visto implicada en el estallido respiratorio como parte de una

¹⁸ Estudiante Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. mpmontoya@unicolmayor.edu.co.

¹⁹ Estudiante Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. gjrincon@unicolmayor.edu.co

²⁰ Universidad Nacional de Colombia. Integrante Externo Grupo REMA

²¹ Universidad Nacional de Colombia. Docente Asociado Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. jnavarrete@unicolmayor.edu.co

²² Instituto Politecnico Nacional de México. Docente Asociado Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. candreacruz@unicolmayor.edu.co

serie de enzimas que producen diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno como (RNS) como parte del mecanismo de defensa en la inmunidad innata, su acción ha sido mayormente estudiada en levaduras, sin embargo, estudios recientes corroboran su papel en diversas infecciones por virus, parásitos y bacterias en diferentes sistemas del cuerpo humano. Por otro lado, se ha descrito que existe la posibilidad de presentar deficiencia primaria de MPO como un trastorno autosómico recesivo, que presenta polimorfismos asociados con el procesamiento postraduccional defectuoso de la proteína precursora y otras con errores pre traduccionales. Finalmente, se ha descrito como una enzima potente que es capaz de reaccionar con fosfolípidos y moléculas naturales de los sistemas biológicos contribuyendo a la aparición y exacerbación de enfermedades inflamatorias como vasculitis, aterosclerosis, cáncer y otras en tejidos adyacentes al lugar de inflamación.

Palabras clave: mieloperoxidasa, neutrófilos, antimicrobianos, estallido respiratorio, fagocitosis, microorganismos.

INTRODUCCIÓN

La inmunidad innata es la primera respuesta del sistema inmunitario contra diferentes agentes externos, se compone de células como macrófagos, células dendríticas, PMN y NK. Los humanos poseen en promedio entre un 50-70% de neutrófilos del total de leucocitos; cuando los neutrófilos fagocitan microbios opsonizados, se forma el fagosoma, y por la liberación de enzimas, oxígeno y proteínas de los gránulos lisosómicos al espacio fagosómico se forma el fagolisosoma; posteriormente el complejo NADPH-oxidasa, se ensambla en la membrana del fagolisosoma y canaliza los electrones del NADPH presentes en el citoplasma al oxígeno por transporte a través de la membrana, produciendo aniones superóxido, sufriendo una dismutación que mantiene el pH intrafagosómico neutro y produce H₂O₂ que es un agente antimicrobiano.

Se conoce que la MPO es una proteína miembro de la subfamilia de peroxidasas las cuales tienen entre 576-738 aminoácidos y existen como monómeros, dímeros o tetrámeros, se presentan como isoenzimas; en los humanos existen diversos tipos de peroxidasas como la peroxidasa de eosinófilos (EPO), la lactoperoxidasa (LPO) y la peroxidasa de tiroides (TPO). Se encuentra codificada en el segmento q12-24 del brazo largo del cromosoma 17. El producto transcripcional primario de este gen consta de 11 intrones y 12 exones, se sintetiza durante la etapa promielocítica del desarrollo de células mieloides, y el producto resultante de la traducción principal se somete a

glicosilación co-traducciona, posteriormente, a partir de aproMPO se forma la proMPO (enzimáticamente inactiva) debido a la unión covalentemente un grupo prostético hemo a la proteína el cual permite su salida del RER, su maduración y que salga al gránulo azurófilo, donde finalmente pasa por tres modificaciones obteniendo la MPO madura.

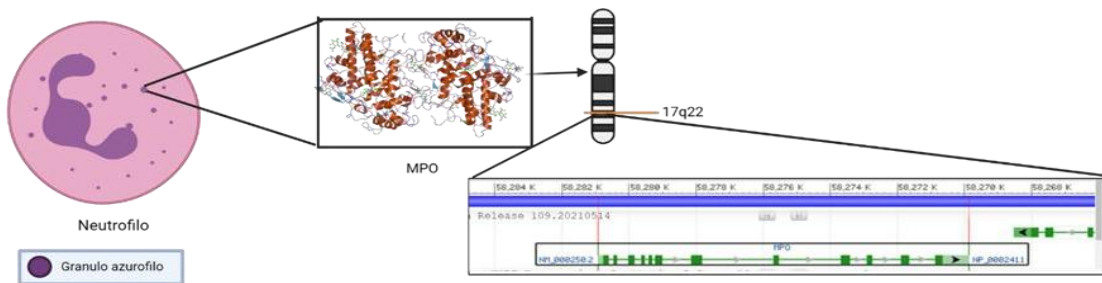
Esta forma proteica es una glicoproteína tetramérica, constituida por 4 subunidades que forman 2 homodímeros. Cada uno de ellos contiene una subunidad α (pesada) de aproximadamente 59 kDa y una subunidad β (ligera) de aproximadamente 14 kDa, con un peso total de 130-150 kDa ; la proteína está compuesta por un par de protómeros idénticos que contienen polipéptidos pesados-ligeros unidos covalentemente a través del grupo hemo único en cada protómero, y los dos protómeros unidos entre sí mediante un enlace disulfuro simple.

Por lo general, la mayoría de las reacciones de las peroxidasas implican la interacción con oxidantes como el H_2O_2 , hidroperóxidos de alquilo, ácidos peroxibenzoicos, ión hipoclorito (OCl^-), ion hipobromito (OBr^-), ion clorito (ClO_2^-), anión bromato (BrO_3^-), ion peryodato (IO_4^-), ácido m -nitrobenzoico, etc. En este sentido, según varios estudios, la MPO tiene un papel crítico en la defensa contra diversos microorganismos cuando existe una alta carga a nivel sistémico, por ende, la generación de los productos oxidativos generados por MPO y NADPH oxidasa como el HOCl y el oxígeno contribuyen a la muerte de estas levaduras.

GENERALIDADES DE LA MPO

La MPO es una enzima presente en neutrófilos, monocitos y macrófagos de los diferentes fluidos biológicos como saliva, líquido sinovial, semen, entre otros, además, en tejidos como corazón, riñón, piel, hígado y placenta. La enzima se encuentra localizada a nivel lisosomal, en los gránulos azurófilos, constituye el 2-5 % de las proteínas del PMN, con una concentración en sangre humana normal de alrededor del 1 nM. Esta enzima fue aislada por primera vez por Agner en 1941, denominándose verdoperoxidasa, y posteriormente en 1958 se purificó en forma cristalina. Ahora bien, la MPO al ser una proteína miembro de la subfamilia de peroxidasas consta de aproximadamente entre 576-738 aminoácidos, los cuales existen como monómeros, dímeros o tetrámeros. Genéticamente se encuentra codificada en el segmento q12-24 del brazo largo del cromosoma 17, y la expresión del *gen mpo* ocurre entre las etapas tardías de mieloblastos y promielocitos del desarrollo mieloide normal y disminuye rápidamente a medida que las células se diferencian (Figura 1)

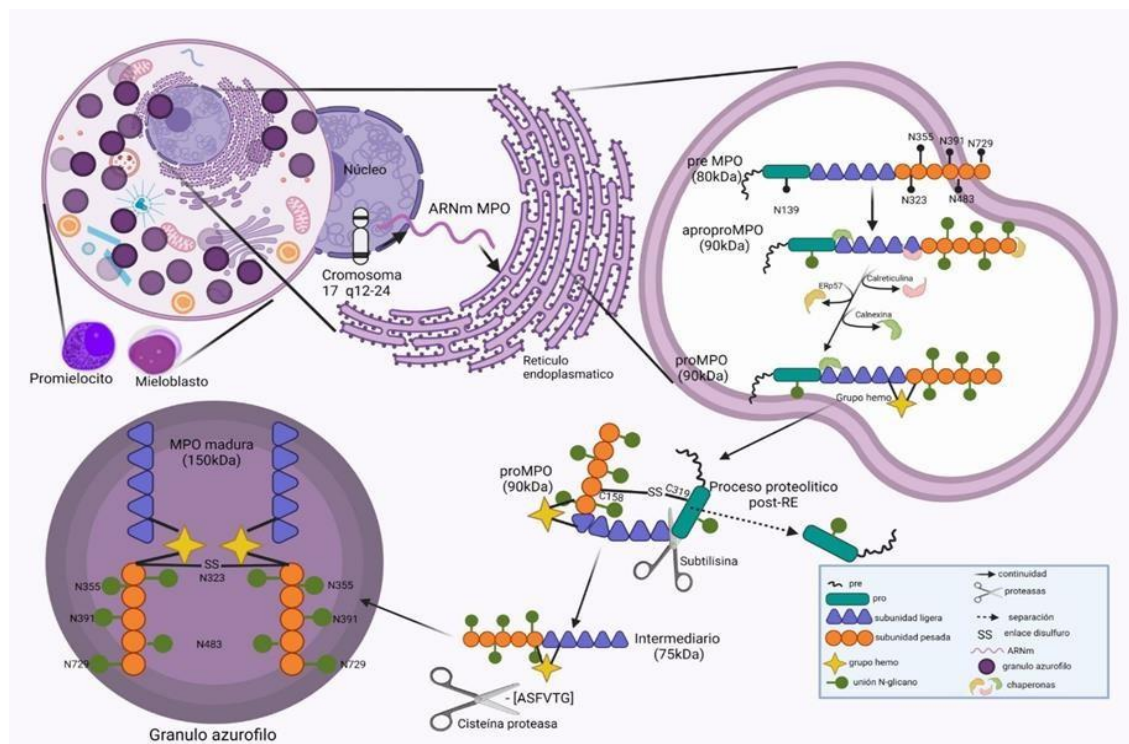
Figura 1. Localización *gen mpo*. La MPO constituye el componente principal de los gránulos azurófilos de los neutrófilos, su gen se encuentra localizado en el cromosoma 17



El proceso de biosíntesis de MPO es complejo e incluye varios pasos de procesamiento: eventos proteolíticos, adición de hemo, adiciones de N-glicanos y dimerización; como se mencionó anteriormente, estos procesos se dan en la etapa promielocítica del desarrollo de células mieloides como los neutrófilos. Inicialmente, el producto resultante de la traducción principal o preMPO se somete a glicosilación co-traducciona en el retículo endoplasmático rugoso (RER) únicamente en los seis residuos de asparagina (N139, N323, N355, N391, N483 y N729) con el fin de generar apoproMPO, la cual se diferencia por que presenta cadenas laterales ricas en manosa de 90 kDa, y por ser un producto enzimáticamente inactivo, así mismo, la apoproMPO tiene la capacidad de formar complejos con chaperonas como calreticulina, ERp57 y calnexina en el RER, en particular el complejo que puede formar con la calnexina es de forma transitoria tanto con apoproMPO como con proMPO, mientras que ERp57, calreticulina y calnexina se asocian de forma transitoria sólo con apoproMPO; posteriormente, a partir de apoproMPO se forma la proMPO, que igual que su precursor es enzimáticamente inactiva, el paso de apoproMPO a proMPO se debe a la unión covalente de un grupo protésico hemo a la proteína para permitir su salida del RER, su maduración y pasó al gránulo azurófilo, lo que significa que la proMPO se transfiere al aparato de Golgi y los gránulos donde los eventos proteolíticos adicionales conducen al monómero MPO; por lo anterior, transcurren tres modificaciones de la proMPO en el compartimiento post-RER donde una convertasa de tipo subtilisina

escinde el propéptido de 116 aminoácidos de proMPO, luego, una cisteína proteasa escinde un hexapéptido (ASFVTG) y finalmente, la MPO madura existe como un dímero que contiene un sitio de unión al calcio que estabiliza la estructura, y mantiene los sitios N-glucanos para participar enzimáticamente dentro del estrés oxidativo; la MPO madura está compuesta por un par de protómeros idénticos que contienen polipéptidos pesados-ligeros unidos covalentemente a través del grupo hemo único en cada protómero, y entre sí, unidos mediante un enlace disulfuro simple de la proteína con subunidades alfa y beta por la cisteína 369, la subunidad alfa tiene 57 kDa con 467 aminoácidos, y la beta 12 kDa con 112 aminoácidos (Figura 2).

Figura 2. Proceso de biosíntesis de la MPO en el RER durante el desarrollo de células mieloides humanas (promielocíticas y mieloblasto)



Nota: Se observa el proceso de biosíntesis de la MPO donde el *gen mpo* se transcribe y se genera el ARNm, el cual se dirige al RER, y allí por el proceso de traducción mediado por los ribosomas se genera el producto primario de la traducción de la MPO, se produce la modificación postraduccional del preMPO, se genera la aproMPO a la cual se unen chaperonas, luego se da la unión covalente de un grupo prostético hemo a la proteína para permitir su maduración y pasó al gránulo azurófilo. Una vez está en el compartimiento post-RER, se da el procesamiento proteolítico mediado por una convertasa, luego una cisteína escinde un hexapéptido (ASFVTG) y finalmente, la MPO madura existe como un dímero que pasa al gránulo azurófilo.

Cabe destacar que el sitio activo de la MPO madura contiene un grupo hemo que está relacionado con la protoporfirina IX, lo que le permite estructuralmente tener una cavidad con estrecha abertura de forma ovalada, y a partir de esto se han descrito cuatro formas de MPO dependiendo del estado de oxidación del hemo; estas son: MPO nativas que contienen la forma férrica (Fe(III)); Compuesto I con la forma de catión-oxoferril (Fe(IV)=O) que es una especie de radical libre; Compuesto II (Fe(IV)-OH) y Compuesto III (Fe(III)O₂). Así mismo, el carácter catiónico de esta proteína permite su unión a moléculas con carga negativa como lipoproteínas o proteoglicanos presentes en la pared de diversos microorganismos e incluso de la pared endotelial, así mismo, la proMPO monomérica puede llegar a sintetizarse *in situ* en sitios de inflamación como placas de aterosclerosis, y por ende ser activo y promover la oxidación y la formación de radicales libres de oxígeno.

PROPIEDADES DE MPO

La proteína MPO contiene motivos conservados en los lados proximal y distal del grupo hemo esencial, un sitio de unión al calcio (Ca⁺²) y al menos dos enlaces covalentes que unen el grupo hemo a la columna vertebral de proteínas. Además, de los enlaces de éster conservados en la bolsa de hemo, MPO contiene un tercero, un enlace de sulfonio entre el grupo 2-vinil y la metionina. La presencia del enlace de sulfonio le da poder a MPO con cualidades espectrales únicas, así como un mayor potencial oxidante. De manera que, los neutrófilos deficientes en MPO son notablemente menos eficaces para matar *C. albicans* y *Aspergillus hyphae*, generando infecciones recurrentes por levaduras. Debido a ciertas causas como la exposición a metales pesados como cadmio (Cd⁺²), cobre (Cu⁺¹⁺²), cromo (Cr⁺³) y níquel (Ni⁺²), así como diferentes patógenos como las bacterias que inducen o suprimen los niveles de ARNm se puede regular la actividad de MPO. Por otro lado, la desregulación de la MPO también se ha visto implicada en enfermedades como la artritis reumatoide (AR), Alzheimer, esclerosis múltiple (EM), la aterosclerosis, cáncer de pulmón y en el síndrome coronario agudo (SCA). Lo anterior debido a la liberación descontrolada de MPO en el sitio de infección, generando inflamación y daño tisular incluso cuando no existe una causa aparente de infección.

PAPEL DE LA MPO EN EL SISTEMA INMUNE E IMPORTANCIA DE NEUTRÓFILOS

En el momento que los neutrófilos fagocitan microbios opsonizados, se forma el fagosoma, y por la liberación de enzimas, oxígeno y proteínas de los gránulos lisosómicos al espacio fagosómico se forma el fagolisosoma; posteriormente el complejo NADPH-oxidasa, se ensambla en la membrana del fagolisosoma y canaliza los electrones del NADPH presentes en el citoplasma al oxígeno por transporte a través de la membrana, produciendo aniones superóxido dentro del fagolisosoma, el cual sufre una dismutación que mantiene el pH intrafagosómico neutro y produce H_2O_2 el cual es un agente antimicrobiano. Adicionalmente, con el fin de descondensar la cromatina y que se lleve a cabo el proceso de NETosis, se liberan trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) permitiendo la liberación de redes de cromatina con histonas, proteínas citoplasmáticas del citoesqueleto o proteínas granulares hacia el medio extracelular para atrapar y destruir patógenos.

Se ha evidenciado que los neutrófilos son células complejas que actúan como efectores importantes de la inflamación aguda, crónica y en la respuesta inmune innata, también participan en la cicatrización de heridas y limitan activamente el auto-reclutamiento mediante la liberación de moléculas endógenas que inhiben la activación de la integrina o los cambios en el citoesqueleto. Como se ha mencionado anteriormente, los neutrófilos tienen múltiples funciones, por eso mismo representan el leucocito predominante en la circulación, y por tanto el primer respondiente a la infección, esta última acción lo realizan mediante la ingestión de microorganismos, para esto activan y ensamblan la NADPH oxidasa en el fagosoma, generando anión superóxido y H_2O_2 . La acción antimicrobiana más rápida y completa de los neutrófilos contra muchos organismos se basa en los esfuerzos combinados de la proteína MPO y H_2O_2 de la oxidasa NADPH para oxidar el Cl^- , generando así HClO y una gran cantidad de productos de reacción aguas abajo (Figura 3).

Como se mencionó anteriormente, cuando los neutrófilos se activan durante una infección se produce el estallido respiratorio, en este proceso se liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) que en conjunto con las enzimas presentes en los gránulos eliminan microorganismos y controlan la diseminación de enfermedades, sin embargo, también se ha reportado que la acción de estas enzimas propicia el medio para lesionar tejidos normales donde se encuentre en el foco de infección debido a su alta actividad inflamatoria.

Durante el estrés oxidativo la MPO reacciona con el H₂O₂ proveniente de las células fagocitarias activadas por contacto con partículas extrañas, formando un complejo enzima-sustrato con una fuerte capacidad oxidativa (reacción 1). Este complejo se combina con el haluro, generalmente cloruro, que se oxida para formar el ácido hipocloroso (HOCl) (reacción 2). El compuesto I puede ser reducido a compuesto II por un exceso de H₂O₂. Por ejemplo, concentraciones mayores a 20 mM lo transforma parcialmente y mayores de 200 mM completamente, o por la presencia de un agente reductor (AH₂) como por ejemplo el ditioneol, cisteína, glutatión y cisteamina (reacción 3). Este compuesto II, a pesar de ser bastante estable puede reducirse a MPO férrica en presencia de un agente reductor o el radical superóxido (O₂⁻) (reacción 4) o también puede oxidarse a compuesto III bajo concentraciones elevadas de H₂O₂ (2-3 mM) (reacción 5). Por otra parte la MPO nativa puede ser oxidada por el O₂ a oximieloperoxidasa (compuesto III) (reacción 6). En presencia de un agente reductor (RSH), la enzima se reduce a la forma ferro, que se oxida en presencia de O₂ para dar lugar al compuesto III que tiene capacidad oxidante. Figura 4.

El ácido hipocloroso (reacción 2) es un potente agente oxidante que si bien contribuye al mecanismo de defensa contra los agentes infecciosos, puede actuar sobre las células del hospedero lo que provocaría inactivación de a-antiproteinasas, entrecruzamientos de proteínas y reacción con ácidos grasos insaturados para formar clorhidrinas, las cuales pueden desestabilizar las membranas celulares. De aquí que el HOCl es un candidato a causar mucho del daño mediado y dar lugar al oxígeno singlete (reacción 7) o reaccionar con aminos para formar las N-cloraminas que son altamente reactivas y presentan un largo tiempo de vida media (reacción 8).

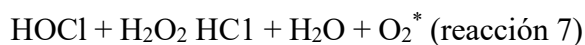
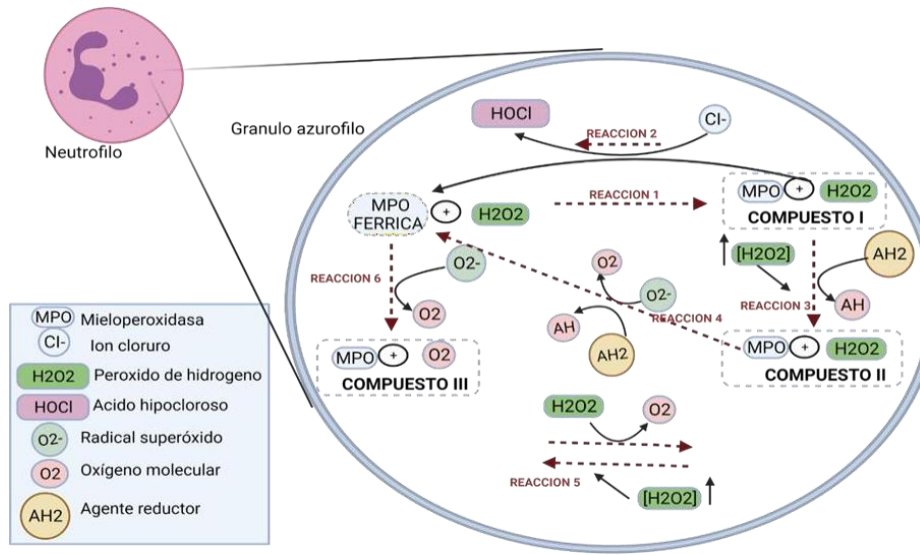


Figura 4. Procesos de reacción de la MPO



Nota: Los neutrófilos contienen 4 formas de MPO, las cuales se denominan MPO nativa o férrica, compuesto I, compuesto II, compuesto III, los cuales tienen similitud en su composición aminoacídica y actividad. La MPO reacciona con el H₂O₂ proveniente de las células fagocitarias formando un complejo enzima-sustrato (cloruro) con una fuerte capacidad oxidativa. Modificado de García Morales OH et.al. 1998

Finalmente, según la literatura, la MPO tiene un papel crucial en la lucha contra los patógenos por sus propiedades virucidas y bactericidas. Por ejemplo, in vitro experimento, la MPO administrada fue eficaz inactivando la carga del VIH incluso sin proporcionar sustrato para la enzima; esto debido a que la enzima produce ácido hipocloroso a partir de H₂O₂ y cloruro, capaces de oxidar la mayoría de las biomacromoléculas; y durante algunas condiciones patológicas como la infección por virus de la hepatitis C, LMPO y las especies reactivas incluidas dentro de los lisosomas pueden liberarse y circular.

ENZIMOLOGÍA DE LA MPO COMO PRIMERA LÍNEA DE DEFENSA CONTRA MICROORGANISMOS FAGOCITADOS

Como se ha mencionado anteriormente, los neutrófilos humanos, son los primeros respondedores celulares a los microorganismos invasores, y en aquellos pacientes que presenten defecto cuantitativos o cualitativos en los neutrófilos tienden a presentar mayor número de infecciones que causan morbilidad y mortalidad, lo que proporciona una confirmación clínica del importante papel de los neutrófilos normales para la salud, así también, de sus enzimas y compuestos endógenos que participan en la respuesta oxidativa.

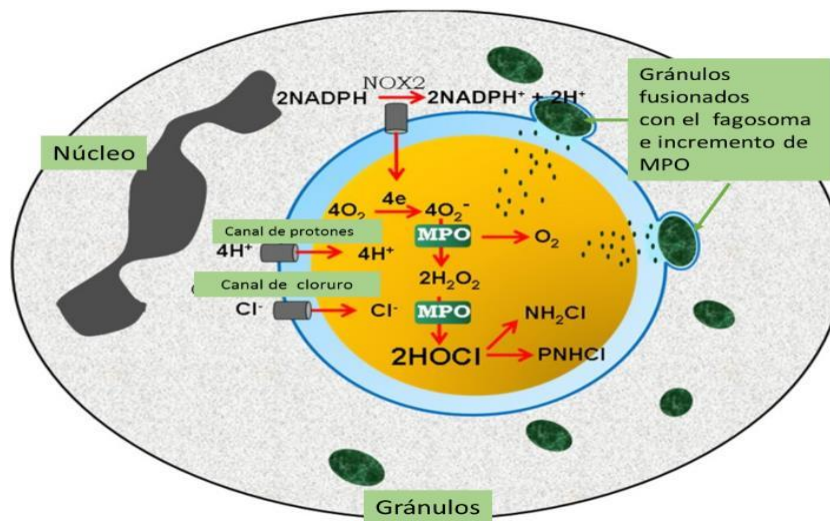
En este caso, la actividad antimicrobiana dependiente de neutrófilos contra los microbios ingeridos en el fagolisosoma representa la colaboración de múltiples agentes, incluidos los prefabricados durante el desarrollo de granulocitos en la médula ósea y los generados de novo después de la activación de neutrófilos. Además, la respuesta innata no sólo está condicionada a los neutrófilos, sino también a los agentes extracelulares y con otras células inmunitarias con los que colaboran para eliminar y degradar de forma óptima los microbios invasores. Cabe destacar, la complejidad de los eventos mediados por MPO durante las respuestas antimicrobianas endógenas, y la sinergia entre el NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) oxidasa y la fosfolipasa A(2) del grupo IIA derivada del plasma.

La MPO nativa es capaz de eliminar un amplio espectro de microorganismos, incluidas bacterias tanto Gram positivas como Gram negativos; incluso, según sus estudios la MPO podría combatir las bacterias resistentes a los antibióticos, lo que la hace muy útil para el tratamiento de infecciones nosocomiales e infecciones mixtas, siendo este un método de reducción de la morbilidad y mortalidad de las infecciones pulmonares inducidas por *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina.

Durante las dos últimas décadas han surgido más de 20 nuevas enfermedades infecciosas, y han aumentado el caso de bacterias multirresistentes las cuales son complicadas de manejar, en este caso, la importancia de la MPO como primera línea de defensa contra microorganismos fagocitados recae en la resistencia al tratamiento convencional, lo que resulta en una enfermedad prolongada, mayor riesgo de muerte y altos costos de atención médica y por ende, en la necesidad urgente de descubrir nuevas clases de agentes antimicrobianos, siendo la MPO un antimicrobiano que juega un papel importante en la defensa del huésped. También se ha observado que los neutrófilos deficientes en MPO eliminan muchas especies de microbios patógenos más

lentamente que los neutrófilos normales y que los ratones deficientes en MPO sucumben más fácilmente a ciertos patógenos. Con base en la evidencia acumulada, el proceso por el cual los neutrófilos generan superóxido y luego usan MPO para convertirlo en HOCl y cloraminas bactericidas se describe en la siguiente Figura 5.

Figura 5. El sistema antimicrobiano mediado por MPO: las propiedades de MPO se adaptan bien a las condiciones del fagosoma de neutrófilos (azul) en la producción de concentraciones microbicidas de HOCl



Nota: El contacto con una partícula ingerible desencadena el ensamblaje de precursores de membrana intrínsecos y citoplasmáticos de una NADPH oxidasa (NOX2), que transfiere electrones desde el NADPH citoplasmático (gris) al oxígeno molecular disuelto en el fagosoma. Los gránulos (verdes) que contienen MPO se fusionan con el fagosoma y liberan su contenido. Luego, la MPO cataliza la oxidación del cloruro mediada por H₂O₂ para formar HOCl, que reacciona con la bacteria (amarillo) o las proteínas de los neutrófilos para producir cloraminas citotóxicas. Modificado de Klebanoff SJ, et.al.2013.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MPO CONTRA BACTERIAS

Respecto a la relación de la MPO y su papel en las infecciones bacterianas, según la literatura, los leucocitos de no pueden matar a la mayoría de las bacterias catalasa positivas, especialmente en pacientes con Enfermedad granulomatosa crónica (EGC), sin embargo matan con facilidad a las bacterias catalasa negativas, debido a que al producir H₂O₂ compensan la deficiencia metabólica de la célula. Las bacterias catalasa positivas quedan atrapadas en un fagosoma en donde no se produce H₂O₂, y al mismo tiempo que las pequeñas cantidades de H₂O₂ producido por los microorganismos

como desecho metabólico son neutralizados por la catalasa de origen microbiano. Por el contrario, los microorganismos catalasa negativos como los neumococos producen H₂O₂ que no llega a neutralizarse por la falta de la enzima y es por ello que se concentra en el fagosoma participando en la muerte del microorganismo.

La actividad microbicida del H₂O₂ se incrementa notablemente por la MPO especialmente en presencia de un haluro. La MPO y el haluro, mientras disminuyen la cantidad de H₂O₂ presente, incrementan su capacidad para atacar otros sustratos vulnerables que son cruciales para la replicación microbiana. La existencia de este mecanismo bactericida en neutrófilos fue descrita por Klebanoff (1967), quien demostró que el halógeno se fija covalentemente a proteínas de la partícula ingerida. La MPO es llevada al fagosoma por desgranulación mientras que los haluros penetran por difusión. Tanto el Cl⁻ como el I⁻ intracelulares pueden servir como cofactores para la actividad bactericida en el fagolisosoma. El I⁻ podría ser captado por los fagocitos a partir de las hormonas tiroideas, e insertado subsecuentemente en las bacterias fagocitadas. Para máximo efecto bactericida del sistema, la bacteria debe estar presente en la mezcla de reacción durante la oxidación del yoduro; esto sugiere la participación de intermediarios lábiles de oxidación del I⁻ más que la participación de productos estables tales como el yodo (I₂). La yodinación de la bacteria por el sistema de la MPO-I⁻-H₂O₂ se ha demostrado químicamente y por autoradiografía.

Los procesos dependientes de la MPO son fuertemente favorecidos por los neutrófilos humanos como mecanismo principal de destrucción oxidativa de *S. aureus* y el superóxido contribuye directamente a su destrucción. Además, que se ha observado que la MPO, se une selectivamente a las bacterias como son *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que a *Streptococcus sanguinis* no se une frecuentemente, esto debido a que es un miembro de la familia de bacterias del ácido láctico y estreptococo viridans, que no sintetiza citocromos y es catalasa negativa. Los productos metabólicos de *S. sanguinis*, es decir, ácido láctico y H₂O₂, proporcionan una acidez y un sustrato óptimos para la oxidación MPO de cloruro a hipoclorito. El hipoclorito puede reaccionar con sustratos orgánicos para producir productos deshidrogenados o clorados, pero cuando el peróxido no es limitante, el hipoclorito reacciona con el peróxido produciendo el singlete de oxígeno, por esto la mala unión de MPO brinda protección y posiblemente una ventaja competitiva a los *Streptococos viridans*.

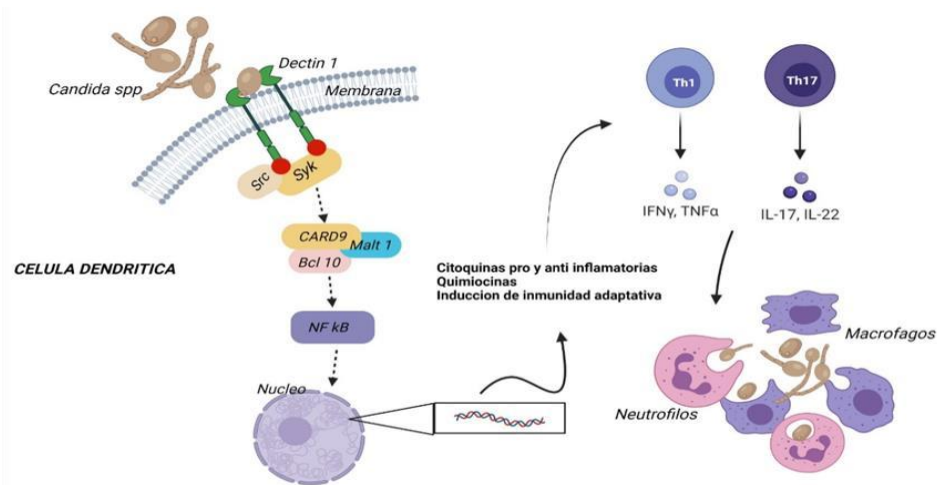
Teniendo en cuenta lo anterior, en el caso de un hombre de 45 años con deficiencia de MPO, el cual padecía una necrosis pancreática provocada por una infección bacteriana, la cual se complicó a una pancreatitis aguda y que posteriormente murió de sepsis, se

evidencia que existe una asociación entre la deficiencia de MPO hereditaria y adquirida y la infección grave ya que la tinción con MPO de frotis de sangre antemortem terminal y aspirados de médula ósea postmortem mostraron ausencia de MPO en células de la serie mielocítica y monocítica.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MPO CONTRA HONGOS

La actividad contra levaduras por parte de la MPO durante la inmunidad innata ha sido mayormente estudiada frente a *Candida spp*; la respuesta empieza por las células epiteliales vaginales como principal defensa antimicrobiana, que no solo constituyen una barrera mecánica y de atrapamiento con su material de superficie similar a la mucina y la queratina, sino que también son capaces de responder mediante la activación celular y la secreción de mediadores inmunes. El reclutamiento de PMN en la vagina, la producción de citocinas como IL-1 β e IL-18 y la activación de los subconjuntos de linfocitos T-helper 1 y T-helper 17 (Figura 6), se les ha atribuido un papel contra *Candida spp*. Así también, la microbiota normal permite que el microambiente vaginal sea lo suficientemente ácido para inhibir la transición de *C. albicans*.

Figura 6. Respuesta inmune frente a *C. albicans* por medio del reconocimiento de β -1,3-glucanos por el receptor Dectina-1



Nota: La Dectina-1 es un receptor de lectina tipo C (CRL) expresado en neutrófilos, se caracteriza por contener dominios conservados de lectina tipo C, se induce la activación de diversas cascadas de señalización, principalmente de la activación de la quinasa Syk y de

CARD9, y por ende, la formación del complejo CARD9-Bcl10MALT1 que corresponde a la vía de activación canónica más importante. Modificado de Vigezzi C., et.al. 2021.

Por otro lado, anteriormente se demostró la capacidad de la MPO en los neutrófilos humanos para unirse al polisacárido manano solubilizado de la pared celular por ejemplo de levaduras como *Candida albicans*. Esta capacidad de unión proporciona la asociación de la enzima con la levadura diana, lo que es esencial para una actividad eficaz. Así mismo, hay reporte donde se menciona que la interacción entre la MPO y el manano no permite que la enzima se disocie fácilmente de la superficie de la levadura objetivo, y por ende, es posible que la enzima no pueda disociarse de la levadura muerta para estar disponible para unirse a objetivos fúngicos adicionales.

Por otro lado estudios de terapia de inmunomodulación se han vuelto cada vez más prometedores, incluso con los β -glucanos, por eso estudiaron la actividad microbicida, la fagocitosis, la producción de especies oxidantes intracelulares, el consumo de oxígeno, la actividad de la MPO y la liberación del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina-8 (IL-8), y concluyeron que los neutrófilos humanos que se enfrentaron con *C. albicans* y *C. glabrata* aisladas de CVV, aumentaron significativamente la producción de especies oxidantes. Sin embargo, aunque existen informes que demuestran que los pacientes con deficiencia de MPO pueden tener una mayor incidencia de infecciones graves, se ha demostrado que la mayoría de los pacientes que carecen de MPO no son particularmente susceptibles a las infecciones crónicas.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MPO CONTRA PARÁSITOS

Las infecciones por helmintos son un desafío para la respuesta inmunitaria, debido al gran tamaño de los gusanos en relación con las células del sistema inmunitario. La respuesta inmune primaria o secundaria a los helmintos comprenden muchas interacciones específicas de las células y moléculas huésped. Se ha identificado que tanto los eosinófilos como los neutrófilos son células efectoras e inmunomoduladoras durante las infecciones por helmintos. La eosinofilia es un factor representativo de las infecciones por helmintos y, en algunas relaciones entre el huésped y el parásito, se ha observado que los eosinófilos matan a los gusanos. Estudios *in vitro* han evidenciado

que los eosinófilos, asociados con anticuerpos específicos, pueden matar los nematodos de *Trichinella spiralis*, *Haemonchus contortus* y *Onchocerca volvulus*.

La MPO purificada de los neutrófilos es tóxica para *Schistosoma mansoni* y *T. spiralis*. Los neutrófilos humanos deficientes en MPO tienen menor capacidad para matar la ameba *Naegleria fowleri*. En el estudio realizado por O'Connell et al, los ratones del ensayo MPO -/- tuvieron una reducción limitada en el tiempo de la inmunidad primaria protectora frente a *Strongyloides stercoralis* una disminución de la inmunidad secundaria protectora, en dicho estudio se concluyó que la MPO de los neutrófilos funciona para matar las larvas de *S. stercoralis*, por consiguiente la toxicidad de la MPO no se limita a los patógenos intracelulares, sino que también se dirige a los organismos extracelulares.

Por otro lado se cree que la mayor capacidad de los macrófagos activados para resistir la infección por el protozoo intracelular *Leishmania donovani*, está relacionada con el aumento en la producción de metabolitos de oxígeno en respuesta a la fagocitosis, además las respuestas metabólicas oxidativas de los macrófagos activados desempeñan un papel importante en la capacidad acelerada de afectar la inmunidad mediada por células. Según la literatura una actividad regulada de NADH oxidasa y NADPH-oxidasa puede explicar la persistencia de parásitos de *Leishmania* en los pacientes. Dado que los ROI, resultado de la actividad del estallido respiratorio, son esenciales para la actividad antileishmanial de los macrófagos, tanto la producción de H₂O₂ y la oxidación de NADPH dependen directamente de la NADPH-oxidasa. Además se cree que la MPO está involucrada en el aumento de la actividad citotóxica de H₂O₂ y O₂ y otros intermedios de oxígeno que pueden mediar los efectos tóxicos de los macrófagos, ya sea directamente o en combinación con MPO. La baja actividad de MPO observada en pacientes con Leishmaniasis visceral activa puede contribuir a la supervivencia de los parásitos en los macrófagos.

Finalmente en la investigación realizada por Montes et al, se evaluó el papel de los NET y la actividad de la MPO en las interacciones de los neutrófilos de roedores con las amebas y en modelos resistentes al absceso hepático amebiano (ALA) y susceptibles a ALA, demostrando que en los ensayos in vitro los ratones producían mayores cantidades de NET y MPO que los hamsters, y la actividad de la elastasa era alta. Sin embargo, la inhibición de NET y MPO promovió un aumento en la viabilidad de la ameba en los ratones. Los ALA de ratón mostraron una presencia más profunda de NET y MPO que los ALA de hámster.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MPO CONTRA VIRUS

Por lo general, en infecciones virales incluidas en COVID-19, la respuesta inmunitaria inflamatoria empieza con la liberación de quimiocinas del tejido afectado, seguida de la infiltración de leucocitos, especialmente neutrófilos y macrófagos. En las primeras etapas de la respuesta inmune, los neutrófilos juegan un papel crucial al neutralizar y destruir proteínas virales con la ayuda de ROS como el singlete de oxígeno, H₂O₂, OH y HOCl, los cuales como se ha mencionado anteriormente son de vital importancia en el sistema inmune.

Para casos más específicos como es el virus de la influenza en el estudio realizado por Bongtae Kim et al , se midió la expresión de MPO en los neutrófilos infectados con el virus de la influenza porcina (SIV) en los pulmones de cerdos experimentalmente infectados con el subtipo H1N2 del virus de la influenza porcina (SIV) mediante inmunohistoquímica, en el cual se determinó distintas señales inmunohistoquímicas positivas para MPO en los cerdos de estudio, también se concluyó que el SIV puede inducir la expresión de MPO en neutrófilo, la expresión de MPO puede estar relacionada con la actividad antiviral, igualmente que la MPO inactivó la actividad de hemaglutinación del virus de la influenza humana, que es un factor clave en el inicio de la infección por el virus de la influenza humana en las células huésped humanas. Además, la MPO modificó las principales proteínas virales, incluidas las proteínas internas de la envoltura, y parece causar la alteración de la configuración de proteínas esencial para la infectividad viral en el virus de la influenza humana.

ACCIÓN DE LA MPO EN LAS ENFERMEDADES NO INFECCIOSAS

El incremento de la actividad de la MPO se ha reportado en varios procesos patológicos y está asociada con un aumento del riesgo al estrés oxidativo, como en el caso de las enfermedades infecciosas (generales o locales), las enfermedades inflamatorias (artritis reumatoidea), vasculitis, aterosclerosis y la isquemia/reperfusión. En estos casos se reporta un aumento significativo de la actividad de MPO, en proporción directa al número de neutrófilos infiltrados en el tejido, por lo que se puede utilizar su actividad como índice de migración leucocitaria y por lo tanto de estrés oxidativo.

Por ejemplo, en la fibrosis quística, la actividad MPO está aumentada proporcionalmente al grado de obstrucción de las vías respiratorias que presentan estos pacientes. La enzima por la vía de inactivación de la alfa-1 antiproteasa contribuye a

incrementar la actividad de la elastasa de los neutrófilos sobre la elastina pulmonar, la cual desempeña una importante función en la fisiopatología de la enfermedad. Con respecto al daño pulmonar en pacientes fumadores se reporta que hay un incremento de ácidos grasos saturados libres que afectan el metabolismo oxidativo de los polimorfonucleares. Se produce un aumento de la actividad MPO y la producción de HOCl, con lo que se amplifica el daño oxidativo mediado por esta enzima en los pulmones.

Por otro lado, respecto a las enfermedades del sistema circulatorio, la MPO es capaz de generar especies reactivas que dañan lípidos y proteínas, y parece contribuir a la aterogénesis a través de las reacciones oxidativas que ésta cataliza. Así mismo, la MPO se utiliza como índice de diferenciación entre las leucemias linfoblásticas y mieloblásticas, por el aumento de la enzima en estas últimas. En los pacientes ciclémicos se reportan aumentos significativos de MPO, con una correlación inversa a la concentración de hemoglobina, lo que sugiere que los polimorfonucleares y el sistema de complemento participan en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad, mientras que, estudios en pacientes con cirrosis hepática y hepatitis crónica muestran niveles aumentados de MPO.

Vasculitis: Las vasculitis, un grupo heterogéneo de trastornos que pueden afectar múltiples órganos y sistemas, así mismo, es una enfermedad multisistémica autoinmune que causa insuficiencia renal rápida y grave, se caracterizan por la inflamación perivascular y la entrada de células inmunitarias en la pared vascular. Las vasculitis se subdividen clínicamente según el tamaño del calibre del vaso y funcionalmente según la causa. Por ejemplo, la granulomatosis de Wegener, la poliangitis microscópica y el síndrome de Churg Strauss son formas de vasculitis sistémicas en las que los neutrófilos y los monocitos macrófagos se infiltran en las paredes de los vasos sanguíneos pequeños, lo que lleva a la destrucción y la oclusión. Estas enfermedades están asociadas con autoanticuerpos dirigidos contra componentes granulares de neutrófilos y monocitos, es decir, anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA). Los antígenos diana más comunes de ANCA en estas vasculitis son la MPO y la proteinasa 3 (PR3). Los neutrófilos estimulados por ANCA dañan las células endoteliales, un proceso que depende de la producción de radicales de oxígeno reactivos y la liberación de componentes granulares como MPO y PR3. El diagnóstico de vasculitis a menudo es un desafío debido a los síntomas inespecíficos, la deficiencia de criterios de diagnóstico estrictos y la falta de buenas pruebas de diagnóstico.

La MPO, una enzima altamente oxidativa producida por las células mieloides proinflamatorias, se está convirtiendo en un biomarcador clave de la inflamación vascular. Aunque el papel exacto de la MPO en la patogenia de la vasculitis sigue sin resolverse, los estudios han sugerido un escenario multifactorial que implica la producción directa de especies reactivas de oxígeno, la facilitación del cebado o la activación de neutrófilos, la elevación de la actividad proteolítica extracelular o la contribución a la disfunción endotelial.

Aterosclerosis: La aterosclerosis es una enfermedad en la que se acumula placa dentro de las arterias, la placa está compuesta de grasa, colesterol, calcio y otras sustancias que se encuentran en la sangre. Con el tiempo, la placa se endurece y estrecha las arterias. Esto limita el flujo de sangre rica en oxígeno a sus órganos y otras partes de su cuerpo. Actualmente hay varios biomarcadores han sido identificados como útiles en el diagnóstico, manejo y estratificación pronóstica de pacientes con enfermedades cardiovasculares, como MPO, IL1RL1, GDF15, CCL4, CCL7 y SORT1.

Por ejemplo, la actividad reducida de la paraoxonasa 1 (PON1), una enzima asociada a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), se ha implicado en el desarrollo de la aterosclerosis cuando hay modificaciones postraduccionales de PON1 que pueden representar mecanismos importantes que conducen a una actividad reducida de la misma. En condiciones ateroscleróticas, se sabe que la MPO se asocia con HDL, generando los oxidantes ácido hipocloroso y dióxido de nitrógeno, que pueden conducir a la modificación postraduccional de PON1, incluidas las modificaciones de tirosina que inhiben la actividad de PON1, y por ende, conllevan a el desarrollo de aterosclerosis tal como se observa en la Figura 7.

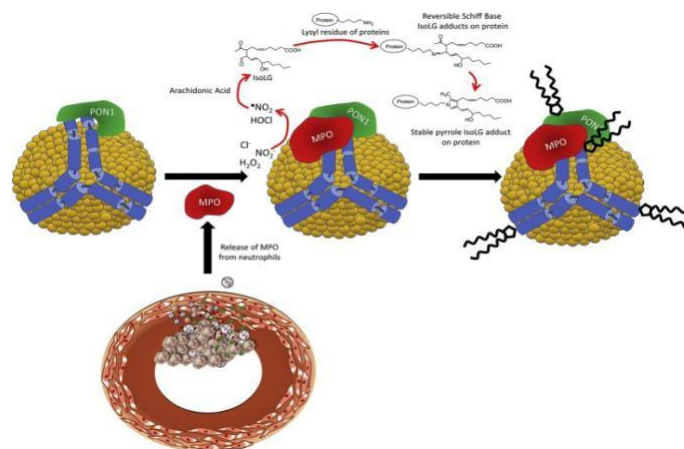


Figura 7. Esquema de la interacción PON1-MPO con apoA-I en HDL y la producción de IsoLG. Los neutrófilos activados en el sitio de las lesiones ateroscleróticas liberan MPO, que se asocia con las HDL circulantes. MPO forma un complejo ternario con apoA-I y PON1. MPO cataliza la formación de especies reactivas de oxígeno como el hipoclorito, que peroxida el ácido araquidónico para formar IsoLG. IsoLG reacciona extremadamente rápido con aminas primarias, como los residuos de lisina de las proteínas HDL para formar aductos covalentes. Tomado de Aggarwal G, 2021.

Por otro lado, se ha demostrado que la sobreexpresión transgénica de la apolipoproteína AI (apoA 1) retrasa la progresión de la lesión de aterosclerosis y promueve la regresión de la lesión en modelos de ratón; sin embargo, la apoA1 está sujeta a oxidación por MPO y consecuente pérdida de función, de otra manera, la MPO también se ve implicada en el desarrollo de aterosclerosis cuando existe la suficiente concentración para oxidar la apoA1, lo anterior debido a que las modificaciones oxidativas de HDL y LDL por MPO ocurren cuando la enzima se absorbe en fracciones proteicas y localmente produce agentes oxidantes para modificar residuos específicos en las apolipoproteínas A-1 y B-100. La oxidación de lipoproteínas por MPO (Mox) conduce a Mox-HDL disfuncionales asociadas con la deficiencia de salida de colesterol y Mox-LDL que ya no son reconocidas por el receptor de LDL y se vuelven proinflamatorias ya que el principal componente proteico de la HDL, es un objetivo importante para la cloración de tirosina catalizada por MPO en la circulación de sujetos con enfermedades cardiovasculares.

MPO Y CÁNCER

Durante algunos años no sea considerado relevante el papel de los neutrófilos en los estudios a nivel tumoral, aunque es un subtipo de leucocitos abundante nivel periférico y que se encuentran con frecuencia infiltrado en tumores sólidos, inicialmente se consideró que la presencia de estos a nivel tumoral eran circunstancial, dado que era difícil creer que este tipo de células con un periodo de vida muy limitado pudieran ejercer un efecto biológico significativo en una enfermedad crónica y progresiva como es el cáncer. Sin embargo, recientemente el papel de los neutrófilos en el desarrollo de enfermedades neoplásicas tomo importancia debido, a el reconocimiento de que esta célula en el proceso inflamatorio cuenta con un papel importante en la carcinogénesis ya que los neutrófilos como células efectoras del proceso antitumoral desarrollado a partir de mecanismos de respuesta inmunitaria las diferentes sustancias como la MPO con capacidad antimicrobiana y citotóxica contenidas en los gránulos de los neutrófilos

que pueden destruir las células tumorales, además que las citoquinas y quimioquinas secretadas pueden reclutar otra serie de elementos celulares con capacidad antitumoral.

Ahora bien, la relación del MPO con el cáncer; radica en que a esta al ser formadora de radicales libres como el H_2O_2 lo que hace, es que puede dañar de manera indirecta el ADN, además que se produce cloraminas que al unirse con el HOCl tienen un poder mutagénico conocido. En varios estudios la actividad de la MPO ha sido relacionada con el metabolismo carcinogénico de los hidrocarburos presentes en el tabaco fumado, por ejemplo; esos hidrocarburos han sido descritos como causantes de la mutación del gen de la proteína p53 observada en el cáncer de pulmón.

Finalmente, los neutrófilos mediante la MPO y la formación de HOCl son potentes inhibidores de la vía de reparación de los nucleótidos, el HOCl es una molécula relativamente estable y que se difunde bien hasta el núcleo celular está, ya que es su función esencial ante la defensa contra diferentes microorganismos; pero puede tener un impacto pro carcinógeno, además que los neutrófilos promueven un microambiente prooxidativo moldeando la matriz extracelular con ayuda diferente citoquinas lo que facilita la migración y extravasación de las células tumorales.

CONCLUSIONES

La MPO es una proteína antimicrobiana presente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos, después de la desgranulación se conjuga en el fagosoma con H_2O_2 , lo que da como resultado una sustancia tóxica para los microorganismos fagocitados. En este sentido, según varios estudios, la MPO tiene un papel crítico en la defensa contra microorganismos cuando existe una alta carga a nivel sistémico, por ende, la generación de los productos oxidativos generados por MPO y NADPH oxidasa como el HOCl y el oxígeno contribuyen a la muerte de los mismos. Por otro lado, se ha visto involucrada en enfermedades inflamatorias, mayormente en la vasculitis y la aterosclerosis, en esta última, debido a la presencia de proteínas cloradas en placas ateromatosas.

En la respuesta inmunitaria contra diferentes microorganismos se genera una gran cantidad de radicales oxigénicos, conocida como estallido respiratorio y representa una estrategia del sistema inmune en la lucha contra las infecciones. Así, los microorganismos patógenos se han visto obligados a plantear la lucha contra los radicales libres en un doble frente: por una parte la protección frente a los radicales generados en su propio metabolismo aerobio y por otra la defensa frente al contacto con células fagocíticas y sus radicales libres específicamente producidos contra ellos. A esta resistencia frente a los ROS contribuyen enzimas antioxidantes tales como las

superóxido dismutasas (SODs) y las catalasas, que intervienen en la eliminación de algunas moléculas generadas en la cascada de reacciones iniciada por la NADPH oxidasa fagocítica.

REFERENCIAS

- Aggarwal, G., May-Zhang, LS., Yermalitsky, V., Dikalov, S., Voynov, M.A., Amarnath V, et al. (2021). Myeloperoxidase-induced modification of HDL by isolevuglandins inhibits paraoxonase-1 activity. *J Biol Chem* [Internet]. [cited 2022 Mar 21];297(3). Available from: [/pmc/articles/PMC8390528/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/390528/)
- Allen, R.C., Stephens, J.T. (2011). Reduced-oxidized difference spectral analysis and chemiluminescence-based Scatchard analysis demonstrate selective binding of myeloperoxidase to microbes. *Luminescence* [Internet]. [cited 2022 Mar 21];26(3):208–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21681911/>
- Aratani, Y. (2018). Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys*. 640(November 2017):47–52
- Aratani, Y., Kura, .F, Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., et al. (2002). Critical role of myeloperoxidase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. *J Infect Dis*. 185(12):1833–7.
- Beckman Coulter. Mieloperoxidasa - Beckman Coulter [Internet]. [cited 2021 Aug 8]. Available from: <https://www.mybeckman.co/reagents/coulter-flow-cytometry/antibodies-and-kits/single-color-antibodies/myeloperoxidase>
- Cassone, A. (2015). Vulvovaginal *Candida albicans* infections: Pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 122(6):785–94.
- Contis, A., Cruz, A., Campos, R., Cárdenas, LM., Aguayo, JE., Rojas, S., et al. (2020) Neutrophil extracellular traps and MPO in models of susceptibility and resistance against *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol* [Internet]. Jun 1 [cited 2022 Mar 21];42(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32187688/>

- Coremans, C., Delporte, C., Cotton, F., Van De Borne, P., Boudjeltia, KZ., Van Antwerpen, P. (2021). Mass Spectrometry for the Monitoring of Lipoprotein Oxidations by Myeloperoxidase in Cardiovascular Diseases. *Molecules* [Internet]. Sep 1 [cited 2022 Mar 21];26(17). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34500696/>
- Crawford, FC., Freeman, MJ., Schinka, JA., Morris, MD., Abdullah, LI., Richards, D, et al. (2001). Association between Alzheimer's disease and a functional polymorphism in the Myeloperoxidase gene. *Exp Neurol*. 167(2):456–9.
- De Souza, P., Ratti, BA., Da Silva Ribeiro, G., Negri, M., De Lima, NCA., Fiorini, A., et al. (2014). β -Glucan induces reactive oxygen species production in human neutrophils to improve the killing of *Candida albicans* and *Candida glabrata* isolates from vulvovaginal candidiasis. *PLoS One*.9(9):1–14.
- Del Valle, L., Hernández, R., Acosta, MA., Perez, L. Garridos, G. (2022). El distrés oxidativo y sus implicaciones moleculares en algunas enfermedades infecciosas: una revisión. *Rev Cub Med Trop* 74(3): 1-31.
- Frade-Sosa, B., Raimon, S. (2023). Neutrófilos, trampas extracelulares de neutrófilos y artritis reumatoide: una revisión actualizada para clínicos. *Reumatol Clin*. 19(9):515-526. DOI: [10.1016/j.reuma.2023.08.001](https://doi.org/10.1016/j.reuma.2023.08.001)
- Frangie, Christian, and Jalil Daher. (2022). Role of myeloperoxidase in inflammation and atherosclerosis. *Biomed Rep*. 16.6 : 53. doi: [10.3892/br.2022.1536](https://doi.org/10.3892/br.2022.1536)
- Freeman, TA., Parvizi, J., Della Valle, CJ., Steinbeck, MJ. (2009). Reactive oxygen and nitrogen species induce protein and DNA modifications driving arthrofibrosis following total knee arthroplasty. *Fibrogenes Tissue Repair*. 2(1):1–11.
- Galijasevic, S. (2019). The development of myeloperoxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 1;29(1):1-7. doi: [10.1016/j.bmcl.2018.11.031](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.11.031)
- García, OH., Roche, NP., Flores, RM. (1998). Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: Mieloperoxidasa. *Rev Cuba Investig Biomed*. 17(3):190–7.
- Goud, PT., Bai D, HM. (2021) A Multiple-Hit Hypothesis Involving Reactive Oxygen Species and Myeloperoxidase Explains Clinical Deterioration and Fatality in COVID-19. *Int J Biol Sci* [Internet]. [cited 2022 Mar 21];17(1):62. Available from: [/pmc/articles/PMC7757048/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34500696/)

- Green, PS, Mendez, AJ., Jacob, JS., Crowley, JR., Growdon, W., Hyman, BT. et al, (2004). Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 90(3):724–33.
- Grishkovskaya, XI., Paumann-Page, M., Tscheliessnig, R., Stampler, J. (2017). Hofbauer XS, Soudi M, et al. Structure of human promyeloperoxidase (proMPO) and the role of the propeptide in processing and maturation. *J Biol Chem.* 292(20):8244–61
- Grossl, NA., Candell, AG., Shrit, A., Schumacher, HR. (1993). Myeloperoxidase deficiency and severe sepsis. *South Med J [Internet].* [cited 2022 Mar 21];86(7):832–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8391723/>
- Hoy, A., Leininger-Muller, B., Kutter, D., Siest, G., Visvikis, S. (2002) Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. *Clin Chem Lab Med*;40(1):2–8
- Jiménez, A.(2008). Producción de ROS y mecanismos antioxidantes bajo condiciones adversas en neutrófilos humanos: estado hipertensivo y estrés metabólico [Internet]. Available from: <https://idus.us.es/handle/11441/31665>
- Jin, Z., Zhou, L., Tian, R., Lu, N. (2021). Myeloperoxidase Targets Apolipoprotein A-I for Site-Specific Tyrosine Chlorination in Atherosclerotic Lesions and Generates Dysfunctional High-Density Lipoprotein. *Chem Res Toxicol [Internet].* Jun 21 [cited 2022 Mar 21];34(6):1672–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33861588/>
- Khan, AA., Rahmani, AH., Aldebasi, YH., Aly, SM. (2014). Biochemical and pathological studies on peroxidases -an updated review. *Glob J Health Sci.* 6(5):87–98.
- Khan, A., Alsahli, M., Rahmani, A. (2018). Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Med Sci.* 6(2):33.
- Klebanoff, SJ. (1967). Iodination of bacteria: a bactericidal mechanism. *J Exp Med.* 126: 1063-1076. 9

- Klebanoff, SJ., Kettle, AJ., Rosen, H., Winterbourn, CC., Nauseef, WM. (2013). Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol.* 93(2):185–98.
- Kim, B., Shin, JH., Han, K., Seo, HW., Oh, Y., Kang, I., et al. (2011). Expression of myeloperoxidase in swine influenza virus (SIV)-infected neutrophils in lungs from pigs experimentally infected with SIV subtype H1N2. *Vet Res Commun* [Internet]. Oct 18 [cited 2022 Mar 21];35(7):469–75. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11259-011-9488-4>
- Kitching, AR., Anders, HJ., Basu, N., Brouwer, E., Gordon, J., Jayne, DR., et al. (2020). ANCA-associated vasculitis. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. Dec 1 [cited 2022 Mar 21];6(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32855422/>
- Kolaczowska, E., Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 13(3):159–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3399>
- Kumar, P., Pai, K., Pandey, HP., Sundar, S. (2002) NADH-oxidase, NADPH-oxidase and myeloperoxidase activity of visceral leishmaniasis patients. *J Med Microbiol* [Internet]. Oct 1 [cited 2022 Mar 21];51(10):832–6. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/0022-1317-51-10-832>
- Lockhart, J., Sumagin, R. (2022). Non-canonical functions of myeloperoxidase in immune regulation, tissue inflammation and cancer." *Int J Mol Sci.* 23(20):12250. doi: 10.3390/ijms232012250.
- Mazo, Sara Isabel Osorio. (2023). Biomarcadores para el diagnóstico del síndrome de reconstitución inmune. *Ciencia y Salud* 7(1): 27-35 doi: [10.22206/CYSA.2023.V7I1.PP27-35](https://doi.org/10.22206/CYSA.2023.V7I1.PP27-35)
- Miyasaki, KT., Nemirovskiy, E. (1997). Myeloperoxidase isoform activities released by human neutrophils in response to dental and periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 12(1):27–32
- Montoya Estrada, M P., Rincón G. (2022). Identificación de polimorfismos en el gen mieloperoxidasa y su papel en candidiasis vulvovaginal recurrente por *Candida* spp en pacientes de Bogotá DC. Trabajo de Grado. Tomado de <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/handle/unicolmayor/5717>

- Nagra, RM., Becher, B., Tourtellotte, WW., Antel, JP., Gold, D., Paladino, T., et al. (1997). Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 78(1–2):97–107
- Nauseef, WM. (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: An integrated view. *Immunol Rev.* 2007;219(1):88–102
- Nauseef, WM. (2014). Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cell Microbiol.* 16(8):1146–55.
- Nauseef WM. (2018). Biosynthesis of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 642:1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.02.001>
- NCBI. (2014). MPO mieloperoxidasa [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. [cited 2021 Aug 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4353#gene-expression>
- NIH. (2021). Definición de inmunidad innata - Diccionario de cáncer del NCI - Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. Inmunidad innata. [cited Aug 8]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/inmunidad-innata>
- O’Connell, AE., Hess, JA., Santiago, GA., Nolan, TJ., Lok, JB., Lee, JJ., et al. (2011). Major Basic Protein from Eosinophils and Myeloperoxidase from Neutrophils Are Required for Protective Immunity to *Strongyloides stercoralis* in Mice. *Infect Immun* [Internet]. Jul [cited 2022 Mar 21];79(7):2770. Available from: /pmc/articles/PMC3191984/
- Odobasic, D., Kitching, AR., Holdsworth, SR. (2016). Neutrophil-mediated regulation of innate and adaptive immunity: The role of myeloperoxidase. *J Immunol Res.*;2016.).
- Opoku, E., Berisha, S., Brubaker, G., Robinet, P., Smith, JD. (2022). Oxidant resistant human apolipoprotein A-I functions similarly to the unmodified human isoform in delaying atherosclerosis progression and promoting atherosclerosis regression in hyperlipidemic mice. *PLoS One* [Internet]. Feb 1 [cited 2022 Mar 21];17(2). Available from: /pmc/articles/PMC8815868/
- Roma, P., Modi, P., , Jialal, I. (2023). Myeloperoxidase deficiency." *StatPearls* [update 2023 jul] ; In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470278/>

- Patiroğlu, T., Güngör, E., Belohradsky, JS., Ünal, E., Klein, C. (2013). Myeloperoxidase deficiency: The secret under the flag of unstained cell. *Turkish J Hematol.* 30(2):232–3.
- Quie, PG., White, JG., Holmes, B., Good, RA. (1967). In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *J Clin Invest.* 46(4):668–79.
- Reynolds, WF., Rhee, J., Maciejewski, D., Paladino, T., Sieburg, H., Maki, RA, et al. (1999). Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer’s disease. *Exp Neurol.* 155(1):31–41.
- Reynolds, WF., Stegeman, CA., Cohen, JW. (2002). -463 G/A myeloperoxidase promoter polymorphism is associated with clinical manifestations and the course of disease in MPO-ANCA-associated vasculitis. *Clin Immunol* [Internet]. [cited 2022 Mar 21];103(2):154–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12027420/>
- Rizo-Téllez, S., Meriem, S., Filep, J.(2022). Myeloperoxidase: regulation of neutrophil function and target for therapy." *Antioxidants* 11(11) (2022): 2302. Doi <https://doi.org/10.3390/antiox11112302>
- Rojas-Espinosa, O., Arce-Paredes, P.(2004). Fagocitosis: mecanismos y consecuencias Tercera parte. *Medigraphic. Volumen 29 No. 2 A...:55–67.* Rutkowski R, A Pancewicz S, Rutkowski K, Rutkowska J. [Reactive oxygen and nitrogen species in inflammatory process]. *Pol Merkur Lek* [Internet]. 2007;134:131–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18044345/>
- Rugeles, M T., Patiño, J., Hernández, JC., Taborda N. (2023). *Inmunología: Una ciencia activa 3.* Ed. Universidad de Antioquia, Medellín Colombia.
- Silvestre, C., Braster, Q., Ortega, A., Soehnlein, O. (2020). Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. *Nat Rev Cardiol.* Jun;17(6):327-340. doi: 10.1038/s41569-019-0326-7.
- Staines, AT., González, ME., Guidos, HE., Hernández, VM, Espinosa, FJ., Espinosa, SE. (2005). *Inmunodeficiencias por alteraciones en las células fagocitarias.pdf.* Medigraphic.14.
- Su, HS., Nahrendorf, M., Panizzi, P., Breckwoldt, MO., Rodriguez, E., Iwamoto, Y, et al. (2012). Vasculitis: Molecular imaging by targeting the inflammatory enzyme myeloperoxidase. *Radiology* [Internet]. Jan [cited 2022 Mar 21];262(1):181–90. Available from: /pmc/articles/PMC3244672/

- Valadez, P., Raftopolou, S., Mihalic, Z., Marshe, G., Kargl, J. (2022). Myeloperoxidase: Growing importance in cancer pathogenesis and potential drug target. *Pharm Ther.* 236 :108052
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.108052>
- Valenta, H., Erard, M., Dupré-Crochet, S., Nüße, O. (2020). The NADPH Oxidase and the Phagosome. *Adv Exp Med Biol.* 1246:153-177. doi: 10.1007/978-3-030-40406-2_9.
- Van Antwerpen, P., Slomianny, MC., Boudjeltia, KZ., Delporte, C., Faid, V., Calay, D., et al. (2010). Glycosylation pattern of mature dimeric leukocyte and recombinant monomeric myeloperoxidase: Glycosylation is required for optimal enzymatic activity. *J Biol Chem.* 285(21):16351–9.
- Van Der Veen, BS., De Winther, MPJ., Heeringa, P. (2009). Myeloperoxidase: Molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxidants Redox Signal.* 11(11):2899–937.
- Vanhamme, L., Zouaoui Boudjeltia, K., Van Antwerpen, P., Delporte, C. (2018). The other myeloperoxidase: Emerging functions. *Arch Biochem Biophys.* Jul 1;649:1–14.
- Vélez, G., Rocha, Y., Arias, A., López, J. (2016). Función del sistema NADPH oxidasa en la formación de trampas extracelulares de los neutrófilos (NETs). *Rev Cuba Hematol Inmunol y Hemoter.* 32(1):43–56.
- Vigezzi, C., Riera, FO., Rodriguez, E., Icely, PA., Miró, MS., Figueredo, CM., et al. (2021). Candidiasis invasora: un enfoque a la infección en el sistema nervioso central. *Rev Argent Microbiol.* 53(2):171–8.
- Waśkiel-Burnat, A., Niemczyk, A., Blicharz, L., Chmielińska, P., Zaremba, M., Gąsecka, A., et al. (2021). Chemokine C-C Motif Ligand 7 (CCL7), a Biomarker of Atherosclerosis, Is Associated with the Severity of Alopecia Areata: A Preliminary Study. *J Clin Med* [Internet]. Nov 1 [cited 2022 Mar 21];10(22). Available from: /pmc/articles/PMC8624305/
- Wright, CD., Nelson, RD. (1988). Candidacidal activity of myeloperoxidase: characterization of myeloperoxidase-yeast complex formation. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1988 Jul 29 [cited 2022 Mar 21];154(2):809–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2840907/>

Bacterias causantes de sepsis, fisiopatología y respuesta inmune

Judith del C. Pacheco²³

Paola Santos²⁴

Jeannette Navarrete²⁵

Claudia Cruz²⁶

RESUMEN

La sepsis y el shock séptico son el resultado de una respuesta inmune exacerbada que presenta reacciones inflamatorias sistémicas frente a un proceso infeccioso. Esta patología es más frecuente en adultos mayores, pacientes con cáncer o que se encuentren inmunosuprimidos, pacientes con infecciones del tracto urinario y con catéteres, personas con enfermedades crónicas como Enfermedad pulmonar obstructiva (EPOC), enfermedad cardiovascular, cirrosis, diabetes, hipertensión y enfermedad renal crónica, entre otras. Los microorganismos más frecuentemente relacionados con la sepsis están *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. En su forma más grave, la sepsis provoca una disfunción de múltiples órganos que puede producir un estado de enfermedad crónica crítica caracterizada por una grave disfunción inmunitaria y catabolismo. Por lo anterior, es importante que se realice un mayor enfoque en el diagnóstico temprano y la reanimación con líquidos, la administración rápida de antibióticos efectivos y otras mejoras en la atención de apoyo para pacientes en estado crítico.

Palabras clave: sepsis, gram negativos, gram positivos, inflamación, citoquinas

SEPSIS

²³ Instituto Politécnico Nacional México, Profesor investigador Sección de estudios de posgrado e investigación de la Escuela Superior de Medicina Instituto Politécnico Nacional de México. eujujeto@gmail.com

²⁴ Universidad Nacional de Colombia. Dirección Maestría Microbiología UNICOLMAYOR psantos@unicolmayor.edu.co.

²⁵ Jeannette Navarrete Universidad Nacional de Colombia. Docente Asociado UNICOLMAYOR. jnavarrete@unicolmayor.edu.co

²⁶ Instituto Politécnico Nacional México. Docente asociado UNICOLMAYOR candreacruz@unicolmayor.edu.co

La sepsis, sepsis severa (SS) y el choque séptico (ChS) representan unos de los problemas más antiguos y comunes en medicina. Los avances en la atención hospitalaria y sobre todo en las unidades de cuidados intensivos (UCI), han aumentado la importancia y diseminación de las guías basadas en evidencias con el objetivo de reducir el inminente riesgo de muerte asociado a sepsis y las secuelas que estas entidades ocasionan en los sobrevivientes, así como los avances en biología molecular han provisto más información de la compleja interacción del patógeno y el huésped. En 1992 se definió por primera vez a la sepsis como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) a una infección, notando que esta puede ser respuesta a múltiples causas infecciosas y que la septicemia no era necesaria. En 2003 se volvieron a revisar estos términos y los signos del SRIS, ya que algunos signos como la taquicardia o leucocitosis ocurren en muchas entidades infecciosas y no infecciosas.

En 2012 la Campaña de Sobreviviendo a la Sepsis (SSC), definió a la sepsis como una respuesta sistémica y perjudicial del huésped a una infección (sospechada o documentada), que puede progresar a una sepsis severa, falla orgánica aguda secundaria a la sepsis o a la hipoperfusión tisular, hipotensión inducida por sepsis (presión arterial sistólica, PAS <90mmHg o presión arterial media, PAM <70mmHg o una disminución de la PAS >40mmHg o menor a dos desviaciones estándar (DS) por debajo de lo normal para la edad en ausencia de otras causas de hipotensión) o choque séptico (ChS, SS sumada a una hipotensión no revertida con reanimación adecuada mediante fluidos).

La Sepsis severa y el Choque Séptico son grandes problemas de salud que afectan a millones de personas en todo el mundo cada año; una de cada cuatro personas muere a causa de ellos y la incidencia de ambos es cada vez mayor. Similar a otras entidades (infarto agudo al miocardio, accidente cerebrovascular o el politraumatismo), la velocidad y la precisión del tratamiento administrado en las horas iniciales después del desarrollo de sepsis tienen grandes posibilidades de influir en el resultado.

Tabla 1. Criterios diagnósticos de Sepsis y Sepsis Severa. Modificada de Dellinger y cols (2014)

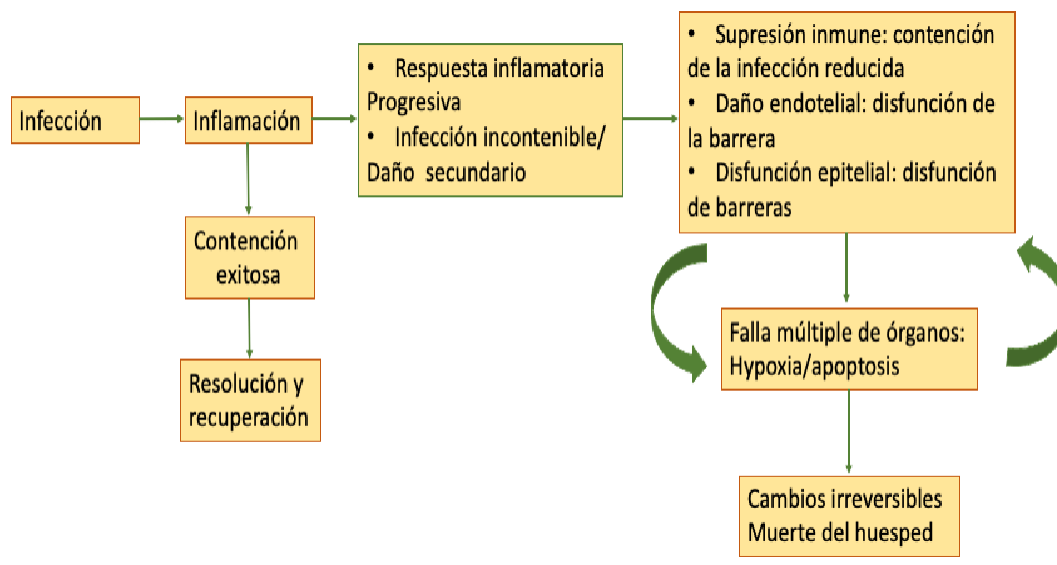
INFECCIÓN DOCUMENTADA O SOSPECHOSA Y LOS SIGUIENTES FACTORES	
	Fiebre > 38,3 °C
	Hipotermia (Temperatura base < 36 °C)

VARIABLES GENERALES	Frecuencia cardiaca > 90/min o más de dos DS por encima del valor normal para la edad
	Taquipnea
	Estado mental alterado
	Edema importante o equilibrio positivo de fluidos (>20 mL/kg durante más de 24 h)
	Estado mental alterado
	Hiperglicemia (> 140 mg/dL) en ausencia de diabetes
VARIABLES INFLAMATORIAS	Leucocitos (recuento de glóbulos blancos WBCI > 12000 uL ⁻¹)
	Leucopenia (recuento de glóbulos blancos WBCI > 4000 uL ⁻¹)
	Recuento de WBC normal con más de 10% de formas inmaduras
	Proteína C reactiva en plasma superior 2 DS por encima del valor normal
	Procalcitonina en plasma superior a 2 DS por encima del valor normal
VARIABLES HEMODINÁMICAS	Presión arterial sistólica < 90 mmHg, PAM < 40 mm Hg en adultos o inferior a dos DS por debajo de lo normal según la edad)
VARIABLES DE DISFUNCIÓN ORGÁNICA	Hipoxemia arterial Pao ₂ /Fo ₂ < 300
	Oliguria aguda (0,5 ml/kg/h durante al menos 2 h a pesar de una adecuada reanimación con fluidos)
	Aumento de creatinina > 0,5 mg/dL 0 44,2 umol/L
	Anomalías en la coagulación (RIN > 1,5 o aPTT > 60 s)
	Íleo (ausencia de borborismos)
	Trombocitopenia (recuento de plaquetas < 100.000 uL ⁻¹)
	Hiperbilirrubinemia (bilirrubina total en plasma > 4mg/dL o 70 umol/L)
VARIABLES DE PERFUSION TISULAR	Hiperlactemia (> 1 mmol/L)
	Reducción en llenado capilar o moteado

	Hipotensión inducida por sepsis
--	---------------------------------

DEFINICION DE SEPSIS GRAVE=HIPOPERFUSIÓN TISULAR O DISFUNCIÓN ORGÁNICA POR SEPSIS (Cualquiera de los siguientes casos debido a la infección)	Lactato por encima de los límites máximos normales
	Diuresis < 0,5 ml/kg/h durante 2 h a pesar de la reanimación adecuada de fluidos
	Lesión pulmonar aguda con Pao ₂ /Fio ₂ <250 con ausencia de neumonía como foco de infección
	Lesión pulmonar aguda con Pao ₂ /Fio ₂ <200 con neumonía como foco de infección
	Creatinina > 2,0 mg/dL (176,8 umol/L)
	Bilirrubina > 2mg/dL (34,2 umol/L)
	Recuento de plaquetas < 100.000 uL
	Coagulopatía (razón internacional normalizada > 1,5)

Figura 1. Patogénesis de la Sepsis



Nota: La Sepsis típicamente se desarrolla posteriormente a una infección o un evento inflamatorio que no es contenido por el huésped. El deslabone en la respuesta inflamatoria lleva a un desequilibrio y daño al sistema inmune y varios tipos celulares del huésped. Las células endoteliales y epiteliales constituyen una importante barrera para detener la infección y la inflamación. El daño a la barrera endotelial y epitelial permite la consecuente diseminación de la infección. La disfunción celular e inmune generalizada se

puede propagar ocasionando falla orgánica, y eventualmente llevando a un estado irrecuperable (Modificado de Buras y cols, 2005).

INFECCIÓN Y SEPSIS

La bacteriemia y la sepsis son problemas comunes en la práctica clínica, donde hay presencia de bacterias en sangre. La sepsis es un diagnóstico clínico que necesita reconocimiento del patógeno causante de la infección, donde se ha demostrado un aumento en la tasa de bacteremia, tanto por bacterias Gram-negativa como Gram-positiva, debido al incremento en el diagnóstico, así como el aumento en el uso de terapias invasivas.

Existen diferencias en los mecanismos por los cuales las bacterias grampositivas producen shock séptico y están relacionadas con la estructura bacteriana, la toxicología y las respuestas del huésped. Las bacterias grampositivas son más invasivas en los tejidos del huésped e inducen una respuesta fagocítica más enérgica comparada con las infecciones causadas por gramnegativos. El peptidoglucano y toxinas secretadas, reemplazan la producción de lipopolisacáridos de los Gram negativos; estos compuestos de la membrana de los Gram positivos, producen señales por medio del mismo receptor que para la endotoxina gramnegativa, con algunas diferencias en sus señales. Se ha reportado que en la infección por Gram positivos hay una respuesta moderada de TNF, los mecanismos que llevan al shock son multifactoriales y de mayor complejidad en el tratamiento. La genética, la estructura bacteriana y los mecanismos de virulencia de los Gram negativos tienen mayor avance investigativo que los analizados para los Gram positivos.

Inicialmente se pensó que los principales organismos que causaban la sepsis bacteriana eran bacterias gramnegativas, sin embargo, en los últimos 25 años se ha demostrado que las bacterias grampositivas son la causa más común de sepsis. Algunas de las bacterias aisladas con mayor frecuencia en la sepsis son *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).

Dentro de los Gram positivos, los estafilococos, bacterias de la microbiota humana, son los que están más frecuentemente asociados a infecciones sanguíneas y en pacientes

susceptibles puede llegar a la sepsis. Un estudio a nivel mundial indicó que tanto el *Staphylococcus aureus* como los *Staphylococcus* coagulasa negativos (CoNS), son los agentes causales de mayor frecuencia de bacteremias; el más prevalente fue el *Staphylococcus epidermidis*, aunque los CoNS no se identificaron a nivel de especie en muchos estudios; esto indica que a nivel mundial se requiere la implementación de métodos de diagnóstico estandarizados e investigar los factores etiológicos utilizando métodos genéticos avanzados.

La bacteremia causada por gramnegativos, puede deberse a la progresión de una infección del epitelio hacia el torrente sanguíneo favorecido por el aumento del crecimiento bacteriano o el daño del epitelio. La progresión a sepsis ocurre cuando la respuesta inmune del huésped disminuye contra las bacterias y se produce disfunción orgánica. En la fase aguda de este proceso, están involucradas la disminución en función y alteración del metabolismo de las células de la respuesta inmune y las células endoteliales y la inadecuada perfusión de oxígeno en las células causando hipoxia e isquemia. En conjunto, si la sepsis no es controlada puede progresar a shock séptico, afectación múltiple de órganos vitales hasta llegar a la muerte. Las bacterias Gram negativas más involucradas en estos procesos son *Escherichia coli* (*E. coli*), algunas especies de *Klebsiella* y *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales representan el 72% de las bacteriemias causadas por gram negativas, siendo la *E. coli* la de mayor prevalencia (59%).

Como factor de riesgo para llegar a la sepsis son las infecciones del tracto urinario, especialmente cuando se realiza un cateterismo. Estudios han demostrado que de los aislamientos de *E. coli*, el 59% estaban relacionadas con atención médica y 51% provenían del tracto urogenital y el 84% de los aislamientos provenían de pacientes con afecciones urinarias y que habían tenido catéter, factor asociado con técnicas estériles inadecuadas durante la inserción o extracción del mismo. Por lo tanto, es importante identificar la problemática para intervenir en la prevención de infecciones en la comunidad y mejorar las medidas de salud pública.

Además, con el incremento en terapias con antibióticos y su uso indiscriminado ha fomentado la resistencia microbiana, factor que no favorece que los tratamientos sean efectivos en casos tan graves como es la sepsis. Estudios han revelado que en personas mayores de 65 años con infecciones del tracto urinario y con tratamientos inadecuados con antibióticos, incrementan el riesgo de convertirse en población vulnerable a padecer infecciones más graves.

Otro factor que contribuye al incremento del riesgo de sepsis son las enfermedades crónicas en donde hay procesos proinflamatorios, pro-oxidativos y pro-coagulantes, los cuales contribuyen al daño del tejido endotelial de los vasos sanguíneos, como es el caso de la Enfermedad pulmonar obstructiva (EPOC), enfermedad cardiovascular, cirrosis, diabetes, hipertensión, y enfermedad renal crónica, entre otras.

EPIDEMIOLOGÍA DE LA SEPSIS

La incidencia de la sepsis, Sepsis Severa y Choque Séptico depende en como la falla orgánica se define y en si esta es atribuible a la infección o hipoperfusión. En Estados Unidos el 2% de los pacientes hospitalizados presentan Sepsis severa, de los cuales la mitad son tratados en una UCI, representando el 10% de las admisiones a estas unidades, el cual excede las 750,000 admisiones por año; sin embargo, diversos factores como el inadecuado diagnóstico pueden hacer estas cifras poco fidedignas. Se estima una distribución similar alrededor del mundo en países desarrollados, sin embargo, la incidencia de esta entidad fuera de una UCI, sobre todo en países no desarrollados, no es bien conocida. Extrapolando esta incidencia se estiman 19 millones de casos al año alrededor del mundo. La sepsis puede resultar de infecciones tanto extra o intrahospitalarias; siendo la neumonía la causa más común (hasta la mitad de los casos), seguido por la abdominal y la urinaria. Los hemocultivos son positivos solo en un tercio del total de casos; siendo negativo en todos los sitios de toma igualmente en un tercio del mismo total. El *Staphylococcus aureus* y el *Streptococcus pneumoniae* son los Gram positivas más comunes; *E. coli*, *Klebsiella sp*, y *Pseudomonas aeruginosa* los Gram-. Siendo más común los gran positivos, con un aumento de los Gram- e infecciones por hongos en los últimos años, probablemente debido al aumento de pacientes inmunocomprometidos. A pesar del nuevo conocimiento en la patogénesis de la sepsis en los últimos años, la Sepsis y Sepsis severa, se mantienen con una mortalidad elevada e inaceptable variando de 18-50%. Esta mortalidad aun con el apoyo de una UCI para los pacientes que llegan a desarrollar Choque Séptico, continúa siendo elevada, del 20-30% (hace 30 años rondaba el 80%), además, estudios han demostrado que el sobreviviente tiene un riesgo aumentado de muerte durante los siguientes meses o años, dado por el deterioro físico, neurológico, alimenticio y la calidad de vida. En Estados Unidos se registran de 500,000 a 750,000 casos de sepsis al año, con mortalidad de 230,000 pacientes, aproximadamente; en general, la mortalidad del estado de sepsis es del 20 al 50% en el primer mes, teniendo como factores de riesgo una edad mayor de 60 años (70%), sexo

masculino (63%), con comorbilidades de origen pulmonar (47%) o abdominal (34%). En Latinoamérica, existen pocos estudios acerca del comportamiento epidemiológico de la sepsis; sin embargo, en Colombia se realizó un estudio con 826 pacientes diagnosticados con sepsis, de los cuales el 51 % la desarrolló por infecciones adquiridas en la comunidad, el 44 % en la UCI, y solo el 5 % durante la estancia en hospitalización en salas generales; siendo las infecciones intra abdominales el diagnóstico más frecuente en un 18.6 %, seguida por neumonía adquirida en el hospital con 17 %, y la neumonía adquirida en comunidad en un 12.4 %. Las comorbilidades más frecuentes fueron la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), falla cardiaca y diabetes mellitus (DM).

SEPSIS ABDOMINAL

La peritonitis o sepsis abdominal (SA) está definida como una infección peritoneal; esta se puede clasificar en tres grandes grupos: primaria, secundaria y terciaria; además de tener la presencia o no de absceso intraabdominal, según la clasificación propuesta en la reunión de Hamburgo en 1987 y avalada por la sociedad quirúrgica de infección (SIS), por sus siglas en inglés).

La peritonitis primaria (referida como peritonitis bacteriana espontánea) surge en la ausencia de una degeneración anatómica identificable. La peritonitis secundaria, se define como infección de la cavidad peritoneal resultado de la pérdida de las barreras anatómicas del tracto gastrointestinal siendo el tratamiento de elección la cirugía con el objetivo de controlar la fuente de infección y la reducción de la carga bacteriana; siendo el tipo de peritonitis más común. La peritonitis terciaria se concibe como un estadio tardío de la enfermedad, con peritonitis clínica y signos sistémicos de sepsis o SRIS (fiebre, taquicardia, hipotensión, taquipnea, leucopenia o leucocitosis, gasto cardíaco elevado, falla orgánica múltiple, FOM), que persisten posterior al tratamiento de la peritonitis secundaria y sin presencia de organismos patógenos o con patógenos con baja virulencia, como enterococos u hongos, son aislados de exudados peritoneales.

La sepsis abdominal es una patología muy frecuente, compleja, grave y potencialmente mortal. Es una vía final común de muchos padecimientos abdominales (inflamatorios, isquémicos y perforativos) que se atienden en los servicios de cirugía de urgencias. La infección e inflamación peritoneal generan una respuesta inflamatoria sistémica compleja que puede ser leve o severa, dependiendo del grado de contaminación de la cavidad peritoneal. Esta respuesta inflamatoria sistémica genera cambios vasculares, celulares, inmunológicos y metabólicos que, si son persistentes, pueden provocar

efectos isquémicos a diferentes niveles y desencadenar fallas orgánicas diversas (falla renal, hepática, pulmonar, cardiovascular, etc.). La SA es una de las principales causas de admisión y mortalidad en las UCI. La mortalidad de estos pacientes llega a alcanzar el 25%.

Antes de que la terapia quirúrgica fuera usada de forma generalizada, cerca del 90% de todos los pacientes con SA morían. Cuando los principios del tratamiento quirúrgico fueron establecidos y utilizados comúnmente por Krishner en 1926, la mortalidad disminuyó hasta un 50% en grandes series, demostrando que la mejoría de la supervivencia del 40 – 50% debe ser acreditada al manejo operatorio solamente. Desde entonces, a pesar de los innumerables avances en las habilidades quirúrgicas, los agentes antimicrobianos y los cuidados intensivos, la mortalidad de la peritonitis se reporta en un intervalo del 3.6% hasta el 41.7%. La dificultad en el control de la SA ha sido motivo de controversia en el campo de la cirugía, y sigue sin definirse la mejor estrategia para lograrlo. El éxito del tratamiento de la peritonitis depende de eliminar la fuente de infección (donde el tratamiento quirúrgico incide directamente en el control del foco infeccioso, como factor más importante, ya que bloquea el origen de la peritonitis, “limpiando” la cavidad abdominal), el uso de antibióticos de una forma temprana, apoyo hemodinámico y soporte nutricional adecuado.

FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS

De forma general la sepsis se puede ver como una disregulación de la respuesta inmune provocada por receptores de reconocimiento de patógeno (PRRs) ocasionados por una invasión de un patógeno, en donde el balance entre la respuesta inflamatoria y antiinflamatoria es vital. Donde la respuesta del huésped, la heterogeneidad de los pacientes, las características de los patógenos, el tipo de infecciones y las fases de la respuesta inmune representan los principales aspectos de su fisiopatología.

Respuesta del huésped en la sepsis

Inicialmente como ya se ha mencionado se pensaba que la sepsis se debía a una respuesta inflamatoria exuberante. Posteriormente, se introdujo la idea del Síndrome de Respuesta Antiinflamatoria Compensatoria (CARS). Concluyendo que el huésped responde de una manera compleja, variable y prolongada en el cual los mecanismos proinflamatorios y antiinflamatorios pueden contribuir a combatir la infección y la reparación tisular, o bien producir daño tisular e infecciones secundarias. La respuesta dependerá de las características del patógeno (carga y virulencia), huésped (características genéticas y enfermedades coexistentes) con diferentes resultados a nivel

local, regional o sistémico. En forma general la respuesta inflamatoria dirigida a eliminar el patógeno ocasiona daño colateral de los tejidos; mientras que la respuesta antiinflamatoria limita el daño local o sistémico de los tejidos y se encuentra relacionada con la susceptibilidad a infecciones secundarias.

La respuesta del huésped a la sepsis es caracterizada por una respuesta proinflamatoria y una respuesta antiinflamatoria inmunosupresora. La dirección, extensión y duración de estas reacciones está determinada por factores propios del huésped (genéticas, edad, enfermedades concomitantes, medicamentos) y del patógeno (virulencia, inóculo). La respuesta inflamatoria es iniciada por la interacción entre los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) expresados por los patógenos y los receptores de reconocimiento del huésped expresados en la superficie de las células (receptores tipo Toll, TLRs, y los receptores para lectina tipo C, CLR), en el endosoma (TLRs) o en el citoplasma. La consecuencia de esta exagerada inflamación es colateral al daño a tejido y la necrosis celular, que resulta en la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), que perpetúan la inflamación actuando sobre los mismos receptores de reconocimiento de patrones liberados por los patógenos.

Inmunidad innata

El patógeno activa las células inmunitarias gracias a la interacción con los receptores del patrón de reconocimiento, como los receptores tipo Toll (TLR), receptores de Lectina tipo C, receptores de ácido retinoico (CLR) y los receptores de unión de nucleótidos (NLRs, nucleotide-binding oligomerization domain–like receptors) siendo estos últimos los que actúan con complejos proteicos llamados inflamomas. Estos receptores reconocen los patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs), resultando en un aumento en la transcripción de genes inflamatorios y la iniciación de la inmunidad innata; además de reconocer los patrones moleculares asociados a daño, (DAMPs) o alarminas, tales como la proteína B1, S100, ADN y ARN extracelular e histonas.

Anormalidades de la Coagulación

La sepsis severa se asocia a alteraciones en la coagulación, siendo Coagulación Intravascular Diseminada (CID) una de las principales complicaciones. El exceso en la deposición de fibrina es causado por la acción del factor tisular (glucoproteína transmembranal expresada por varios tipos de celular). Todo esto debido a la alteración en los mecanismos anticoagulantes (incluido el sistema de la proteína C y antitrombina) y por la comprometida eliminación de la fibrina debido a la depresión de los sistemas fibrinolíticos. Los receptores activados por proteasa (PARs, protease-activated

receptors) forman el puente molecular entre la coagulación y la inflamación. Existen 4 tipos, siendo el PAR1 en particular el implicado en la sepsis; gracias a que este ejerce un efecto citoprotector cuando es estimulado por la proteína C activada (PCA) o a bajas dosis de trombina, pero paradójicamente también ejerce un efecto de daño en la barrera endotelial cuando es activada por altas dosis de trombina. El efecto protector de la PCA en modelos animales depende de su capacidad de activar el PAR1 y no en sus propiedades anticoagulantes.

Mecanismo Antiinflamatorios e Inmunosupresión

Los efectos humorales, celulares o neurales del SI atenúan los efectos nocivos de la respuesta proinflamatoria. Los fagocitos pueden cambiar a un fenotipo antiinflamatorio que promueva la reparación tisular, además de que los linfocitos T reguladores reducen la inflamación. El reflejo neuro inflamatorio, consta en la transmisión a través del nervio vago aferente al tallo cerebral, de donde el nervio vago eferente activa el nervio esplácnico en el plexo celiaco, resultando en la liberación de norepinefrina por el bazo y de acetilcolina por una porción de linfocitos T CD4+. Esta liberación de la acetilcolina es dirigida a los receptores colinérgicos $\alpha 7$ de los macrófagos, que suprime la liberación de citocinas proinflamatorias. Modelos animales han demostrado que la pérdida de este reflejo por vagotomía incrementa la susceptibilidad al ChS, mientras que la estimulación del nervio vago eferente o de los receptores colinérgicos atenúa la inflamación sistémica. Los pacientes que sobreviven a una sepsis inicial pero que continúan en un la UCI tienen evidencia clara de inmunosupresión, reflejada por una reducida expresión del HLA-DR por las células mieloides. Se ha encontrado una expresión aumentada de ligandos inhibidores para los linfocitos T en las células parenquimatosas de bazo y pulmón. El aumento en la apoptosis especialmente de linfocitos B, linfocitos TCD4+ y células dendríticas foliculares se han implicado a inmunosupresión y muerte. La regulación epigenética de la expresión de genes también contribuye a la inmunosupresión.

Disfunción orgánica

La hipoperfusión juega un papel fundamental. Factores como la hipotensión, trombosis y reducción de la deformabilidad de los eritrocitos contribuyen a la disminución del aporte de oxígeno en la sepsis, sepsis severa y choque séptico. La inflamación produce una disfunción del endotelio vascular, acompañado por muerte celular y pérdida de la integridad de la barrera, ocasionando edema. El daño mitocondrial causa estrés oxidativo y otros mecanismos que alteran el uso de oxígeno por la célula, además de

liberar alarminas al medio extracelular (tales como el ADN mitocondrial) que activan a los neutrófilos causando más daño tisular.

La sepsis está asociada a trombosis microvascular causada por la activación de la coagulación (mediada por el factor tisular) y el desbalance de los mecanismos anticoagulantes como consecuencia de la actividad reducida de las vías endógenas anticoagulantes (mediadas por la proteína C activada, PCA, antitrombina y la vida inhibitoria del factor tisular), además del desbalance en la fibrinólisis y el aumento en la liberación del inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1). La capacidad de generar PCA es afectada por la reducción de dos receptores endoteliales: Trombomodulina (TM) y el receptor de PCA. La formación de trombos posteriormente es facilitada por la liberación de sustancias extracelulares de neutrófilos (NETs) liberadas por los neutrófilos dañados; esta formación resulta en hipoperfusión tisular, que es agravada por vasodilatación, hipotensión y la reducción en la deformabilidad de los glóbulos rojos. La oxigenación tisular se ve afectada por la pérdida de la función de la barrera endotelial por la pérdida de la función de la cachetina vascular endotelial (VE), alteraciones en las uniones estrechas, niveles altos de angiopoietina 2 y un desbalance entre el receptor de esfingosina-1 fosfato tipo uno (S1P1) y S1P3 en la pared vascular, que es debido a la inducción preferencial de S1P3 a través del receptor activado de fosfato tipo 1, resultado de la disminución de PCA y trombina. El uso de oxígeno es afectado a nivel subcelular por el daño a nivel mitocondrial debido al estrés oxidativo.

RESPUESTA INMUNE EN SEPSIS

Bacterias gram negativas

Los LPS y otras moléculas producidas por estas bacterias, son reconocidos por los anticuerpos y moléculas del sistema de complemento permiten por medio de la opsonización, efectuar la fagocitosis y la lisis bacteriana. Estas bacterias opsonizadas son fagocitadas por los macrófagos y los polimorfonucleares contribuyendo con la eliminación del patógeno. Esta respuesta inmune genera la liberación de mediadores inflamatorios, cambios vasculares y reclutamiento de células inmunes. Uno de los principales mediadores es la citoquina denominada Factor de necrosis tumoral – alfa (TNF- α), la cual es la primera citoquina liberada después del contacto de los macrófagos con el LPS. Posteriormente con la producción de las interleuquinas (IL) IL-1, IL-6, IL-8, IL12, y los mediadores celulares de la inflamación como el factor activador de

plaquetas (PAF) y los eicosanoides, producen un efecto sobre el tejido circundante. Además, se activan las anafilotoxinas, C3a y C5a derivadas del complemento cuya función es atraer PMN desde la circulación, activarlos, que atraviesen el endotelio vascular facilitado por la vasodilatación y la presencia de moléculas de adhesión celular y realicen la fagocitosis del germen; posteriormente mediante agentes microbicidas oxígeno dependientes e independientes, se da la muerte intracelular del germen. Por otra parte, los PMN producen leucotrienos B₄, FAP que contribuyen aún más con el proceso inflamatorio. Muchos de los daños endoteliales observados en la sepsis son causados por estos agentes (4). Otro mecanismo proinflamatorio es el producido por la acción de los TLR, donde el LPS se une a la Proteína fijadora de Lipopolisacárido que se une al CD14, y activan al receptor Toll 4 (TLR4) induciendo en células de la inmunidad innata la producción de citoquinas proinflamatorias.

Los mediadores inflamatorios secretados por poblaciones de células diferentes, atraen y activan linfocitos T y B. Además, la liberación de mediadores como IL-2, Interferón – gama (IFN γ), Factor estimulante de colonias granulocítica macrófago (GM-CSF), están involucrados en la proliferación y activación de más células mononucleares. La acción de las células inmunes activadas combinada con los efectos de los mediadores inflamatorios causan síntomas como fiebre, daño endotelial, derrame capilar, dilatación vascular periférica, desordenes en la coagulación, microtrombos y depresión miocárdica. Este fenómeno puede resultar finalmente en fallo multiorgánico, shock y muerte.

Bacterias Gram Positivas

En las bacterias gram positivas, el ácido lipoteicoico (ALT), los peptidoglucanos (PGN) y las exotoxinas, son las responsables de la respuesta inmunológica. El ALT y el PGN inducen la producción de óxido nítrico (NO), IL1, IL-6, y TNF- α por monocitos y macrófagos y activar la muerte oxidativa. La sepsis causada por bacterias Gram Positivas se da por la producción de endotoxinas y por la estimulación de la respuesta inmune.

La sepsis por bacterias gram positivas a menudo provienen de la piel, heridas, tejidos blandos y catéteres más que de fuentes genitourinaria o entérica como sucede en el caso de sepsis causada por Gram negativos. Los Gram positivos también son atacados por la fagocitosis y la muerte intracelular realizada por los PMN y macrófagos. Su virulencia también se debe a que estos patógenos actúan como súper antígenos (S. aureus y S.

pyogenes), los cuales sobre estimulan la activación de linfocitos T produciendo parálisis inmunológica, liberación descontrolada de numerosas citoquinas pro-inflamatorias, especialmente INF- γ y TNF- α ., las cuales son las causantes del síndrome de shock tóxico y pueden algunas veces causar falla multiorgánica.

Los ALT inducen la producción de citoquinas como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y otras moléculas activadas en la inflamación. El PG de *S. aureus* induce la transcripción del RNAm de IL-6 e IL-10 en monocitos y células T. El PG y ALT de bacterias gram positivas (*Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Listeria monocytogenes*) se une a receptores Toll (TLR2), que en cooperación con el TLR6 inducen la producción de TNF- α , favoreciendo el proceso inflamatorio.

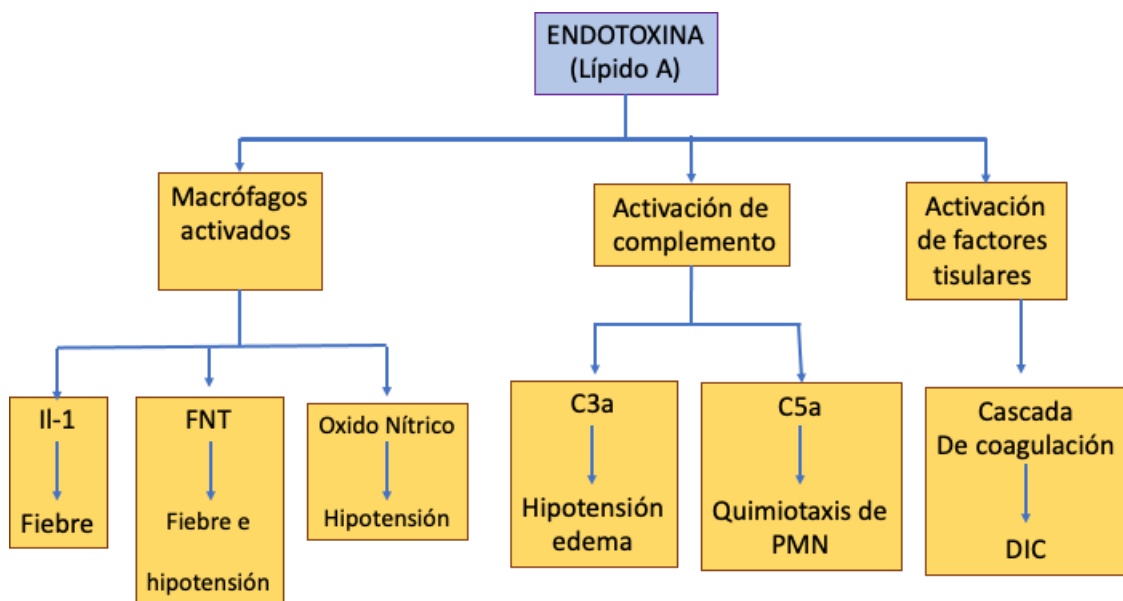
Características y antecedentes de las citoquinas en sepsis y choque séptico TNF- α e IL-1

IL-1 (IL-1 α y la IL-1 β), en conjunto con el TNF- α son las citocinas más estudiadas en la fisiopatología de la sepsis. Ambos son citocinas proinflamatorias que han sido implicadas en un gran número de enfermedades inflamatorias infecciosas y no infecciosas, como la aterosclerosis, AR, osteoartritis y enfermedad de Alzheimer. El TNF- α es una proteína de 17 kDa, que se deriva de las células del SI como los macrófagos y células como los fibroblastos en respuesta a un estímulo invasivo, infeccioso, o inflamatorio. La liberación de TNF- α por los macrófagos comienza 30 minutos después del evento, posterior a la transcripción genética y traducción de ARN, que establece a este mediador como un regulador temprano de la respuesta inmune. Este actúa sobre receptores transmembranales específicos (TNFR1 y el TNFR2), que llevan a la activación de las células inmunitarias y la liberación de mediadores inmunorreguladores. Lleva a una diferenciación en macrófagos por parte de las células progenitoras, promueve la activación y diferenciación de los macrófagos, y prolonga su supervivencia; todos estos efectos promueven las respuestas proinflamatorias de la sepsis. En las células endoteliales, este promueve la expresión de moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1 y la molécula de adhesión vascular (VCAM)-1, y otras quimiocinas; también incrementa la adhesividad de las integrinas en el neutrófilo promoviendo su extravasación a los tejidos. La IL-1 es liberada por los macrófagos activados en un tiempo similar que el TNF- α , a través de la señalización de dos distintos receptores (receptor de IL-1 tipo I (IL-1R1) y el IL-1R2), con efectos comparables sobre las células inmunitarias. Ambos se han identificado como activadores de la coagulación, el TNF- α es un potente promotor de la expresión endotelial procoagulante. Adicionalmente, ambos amplifican las cascadas inflamatorias de una forma autocrina y paracrina activando a los macrófagos para que

secretan otras citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8 y MIF, mediadores lipídicos y reactivos de oxígeno y nitrógeno, produciendo fallas orgánicas. Debido a su habilidad de orquestar la cascada de citocinas, el TNF- α es considerado el regulador maestro de la producción inflamatoria de citocinas; tendiendo la IL-1 un rol regulador importante en esta cascada. Gracias a que existen receptores de citocinas solubles y receptores antagonistas, como los sTNFRs, IL-1R2 y el IL-1Ra, los cuales modulan la acción de estas dos citocinas.

Niveles elevados de sTNFRs e IL-1Ra han sido encontrados en la circulación sistémica de voluntarios sanos a los cuales se les administro una endotoxina. En pacientes sépticos la concentración plasmática de sTNFRs e IL-1Ra se correlaciono con la severidad de la enfermedad, y en el caso del sTNFRs con la mortalidad. En diferentes modelos murinos de ChS, la administración de IL-1Ra incremento la supervivencia, sugiriendo un efecto terapéutico para el IL-1Ra. En cuanto al sTNFRs, se propuso que la proporción entre el TNF- α y el sTNFRs, más que la concentración absoluta de uno u otro, tiene mayor valor pronóstico en pacientes sépticos. Todo esto indicando que el balance entre las citocinas y sus inhibidores solubles es crucial para un pronóstico positivo en este tipo de pacientes. Sin embargo, el mecanismo exacto de este balance no es aún claro.

Figura 2. Efecto de las endotoxinas sobre las principales respuestas del huésped



Modificado de Levinson W, Review of Microbiology and Immunology, 12th Edition.

IL-6

Glucoproteína producida por varias células, especialmente macrófagos, células dendríticas, linfocitos, células endoteliales, fibroblastos y células de músculo liso en respuesta al estímulo por LPS, IL-1, y TNF- α . Concentraciones elevadas de IL-6 están presentes en muchas condiciones agudas, como quemaduras, cirugía mayor y sepsis, con un pico subsecuente a concentraciones altas de TNF- α e IL-1. Los niveles de IL-6 están establemente elevados en estas condiciones y se relacionan con muchos indicadores de severidad, como escalas clínicas, estrés postquirúrgico, trauma, incidencia de síndrome de falla orgánica múltiple (MODS), ChS, y mortalidad. Tiene efectos biológicos como la activación de linfocitos T y B, la activación del sistema de coagulación y modulación de la hematopoyesis. Una función básica es la inducción de la fiebre y la mediación de la respuesta de fase aguda, una reacción sistémica a un estímulo inflamatorio que es caracterizado por fiebre, leucocitosis y la liberación de proteínas de fase aguda hepáticas como la proteína C reactiva, componentes del complemento, fibrinógeno y ferritina. A pesar de estas características proinflamatorias, también se ha demostrado que promueve la respuesta antiinflamatoria; inhibiendo la liberación de TNF- α e IL-1 y promoviendo los niveles circulantes de mediadores antiinflamatorios como la IL-1Ra, sTNFRs, IL-10, TGF- β , y cortisol.

IFN- γ

Es principalmente producido por las células NK, linfocitos TH1, y linfocitos T CD8+ citotóxicos. Su producción está estrechamente regulada y estimulada por las citocinas derivadas de macrófagos especialmente TNF- α , IL-12, e IL-18. Fue descubierto debido a su actividad antiviral. Normalmente no es detectable en el plasma de humanos sanos, pero sus niveles se elevan en pacientes con sepsis; sin embargo, estos niveles no se relacionan con la severidad o mortalidad de la sepsis. Recientemente se ha mostrado un rol en la reversión de la inmunoanálisis inducida por sepsis, durante esta parálisis, los macrófagos muestran una alteración en sus funciones fagocíticas y una reducida liberación de citocinas promotoras TH1 ante la estimulación bacteriana.

IL-10

Citocina homodimérica de 35-kDa producida por células del SI como monocitos, macrófagos, linfocitos B, T y células NK. Tiene una actividad antiinflamatoria; estimula la producción de IL-1Ra y de sTNFRs, neutralizando la acción proinflamatoria de IL-1 y TNF. Se piensa que la IL-10 podría regular la transición de una etapa temprana reversible de sepsis a un tardío e irreversible ChS, además de que recientemente se han estudiado polimorfismos en el gen promotor de IL-10 que afectan la susceptibilidad a la sepsis.

REFERENCIAS

- Angus, Derek, y Tom van der Poll. (2013). Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med*, nº 349 : 51.
- Bai, AD., Lo C., Komorowski, A., Suresh, M., Guo, K., Garg, A., et.al. (2022). *Staphylococcus aureus* bacteraemia mortality: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 28(8):1076-1084. doi: 10.1016/j.cmi.2022.03.015
- Berger, M., Pichard, C. (2012). Best timing for energy provision during critical illness *Critical Care*.
- Bermejo-Martin JF, Martin-Fernández M, LopezMestanza C, et al. (2018). Shared features of endothelial dysfunction between sepsis and its preceding risk factors (aging and chronic disease). *J Clin Med* ;7:1–15.
- Buras, J., Holzmann, B., Sitkoysky, M. (2005). Animal models of sepsis: Setting the stage. *Nature* 4: 1-15.
- Caroline CJ, et al. (1997). Peritonitis: Update on pathophysiology, clinical manifestations and management. *Clinical Infectious Diseases*, nº 24 (1997): 1035-1047.
- Chan, y Peristein. (1987). *In Immunoassay: A practical guide*. New York: Academic Press.
- Cheslyn-Curtis, S, M.C Aldridge, y A.F Dudley. (1990) Effect of acute starvation on plasma fibronectin response to sepsis.» *British Journal of Surgery Society* 77, nº 2 : 199-203.

- Damehri, M. (2013). Intestinal epithelial cell apoptosis and loss of barrier function in the setting of altered microbiota with enteral nutrient deprivation. *Front Cell Infect Microbiol*. December. Volume 3, Article 105.
- Dartiguelongue, J. (2021). Systemic inflammation and sepsis. Part II: functional consequences of the storm. *Arch Argent Pediatr*. 119(1):e1-e10. doi: 10.5546/aap.2021.eng.e1.
- Delinger, R.P, M.M Levy, y A. Rhodes. (2012). Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for management of Severe Sepsis and Septic Shock: *Critical Care Medicine Journal*, nº 41:580-637.
- Gonzalez-Calatayud, M., Lopez-Romero, S., Athie-Gutierrez, C., Valdovinos-Gonzalez, C., Urbina-Leon, D. (2011). Influencia de la inmunonutrición sobre el estado general, nutricional y estancia hospitalaria en pacientes postoperados de sepsis abdominal.» *Cirujano General* 33, nº 4: 236-242.
- Girish, R. (2013). Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis. Published online: 05 Nov 2013 Pages 213-218. <https://doi.org/10.4161/viru.27024>
- Hagel, S., Pletz Mw., F M Brunkhorst, H Seifert, W V Kern (2013). Bacteremia and sepsis *Apr*;54(4):399-407. doi: 10.1007/s00108-012-3185-4.
- Kellum, J., Formek, C., Kernan, K., Gómez, H., Carcillo, J. (2022). Subtypes and mimics of sepsis. *Crit Care Clin*. 38(2): 195-211. doi: 10.1016/j.ccc.2021.11.013.
- Kurt, A., Phang, T., McDonald, T., Walley, K. (2001). Enteral feeding decreases gut apoptosis, permeability, and lung inflammation during murine endotoxemia *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; G569–G576.
- Irvin TT. (1989). Mortality and perforated peptic ulcer: a case for risk stratification in elderly patients. *British Journal of Surgery*, nº 76: 215-218.

- Li, XY., Liu, M., Fu YJ., Jiang Yj., Zhang, ZN. (2023). Alterations in levels of cytokine following treatment to predict outcome of sepsis: A metaanalysis. *Cytokine*. 161:156056. doi: 10.1016/j.cyto.2022.156056.
- Lisowska, K., Lauterbach, R., Miedzobrodzki, J., Kosecka, M. (2021) Epidemiology and Pathogenesis of *Staphylococcus* Bloodstream Infections in Humans: a Review . *Pol J Microbiol Mar*;70(1):13-23. doi: 10.33073/pjm-2021-005. Epub 2021 Feb 24.
- Lustug, MK,et.al. (2007). «Colon ascendens stent peritonitis: a model of sepsis adopted to the rat: Physiological, microcirculatory and laboratory changes.» *Shock*, n° 28 : 59-64.
- Malalat, J., Leone, S., Cascella, M., Fiore, M. (2019). Should endotoxin be a research priority in Gram negative sepsis shock?. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 12(8):697-699. doi: 10.1080/17512433.2019.1627871.
- Maier, S, et.al. (2004). Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis.» *Shock*, n° 6 : 505-511.
- Mitchell, E., Pearce, M., Roberts, R. (2019). Gram-negative bloodstream infections and sepsis: risk factors, screening tools and surveillance *British Medical Bulletin*, 132:5–15 doi: 10.1093/bmb/ldz033
- Naitonal_Institute_for_Health_and_Care_Excellence. (2012). Healthcare-associated infections: prevention and control in primary and community care.
- Nedeva, C. (2021). Inflammation and cell death of the innate and adaptative immune system during sepsis. *Biomolecules*. 11(7):1011. doi: 10.3390/biom11071011.
- NHS_Improvement. Guidance on the definition of healthcare associated Gram-negative bloodstream infections. In: Improvement N, ed. *Public Health England*; 2017.
- Ortiz G, Dueñas C, Rodríguez F, Barrera L, de La Rosa G, Dennis R, et al. (2014). Epimediology of sepsis in Colombian Intensive care units. *Biomédica: revista*

del Instituto Nacional de Salud.; 3 4 (1): 4 0 - 7 . Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/271344>

- Oz, HS, TS Chem, y M Neuman.(2009). Nutrition intervention: a strategy against systemic inflammatory syndrome.» *Japan Parenteral enteral Nutrition* 33, n° 4 (jul-ago): 380-9.
- PearseRM. (2012) Mortality After surgery in Europe: a 7 day cohort study. *Lancet*, n° 380.
- Pereira, F., Lima, F., Martins, A., Bertollo, J. (2011). Efectos of short term fasting on the evoluton of fecal peritonitis in mice.» *Acta Cirurgica Brasileira*, n° 26 : 181.
- Pfaffl, M., Graham, H., Demple, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.» *Nucleic Acids Research* 30, n° 9 : 1-12.
- Pieracci, FM. (2007) Management of sever sepsis of abdominal origin. *Scandinavian Journal of Surgery*, n° 96 : 184-196.
- Riche, F. (2013) Local and systemic innate immune response to secondary human peritonitis.» *Critical Care*, n° 17: 1-8
- Rittirsch, D., Hoesel, M., Ward, P. (2007). «The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis.» *Journal of Leuckocyte Biology*. 81: 137-143.
- Schabbaure G; (2012) Polymicrobial Sepsis models: CLP versus CASP. *Drug Discovery Today: Disease Models*, Volume 9, Issue 1, Spring, Pages e17–e21.
- Schutle, W., Bernhagen, J., Bucala, R. (2013). Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets- An Updated View. *Mediators of Inflammation*, mayo: 16.
- Silva, M., Saionara da Gra., Freitas dos Santos, Damiani, C. (2013). Enteral nutrition discontinuation and outcomes in general critically ill patients.» *Clinics* 69, n° 2 : 173-177.
- Sriskandan, S., Cohen, J. (1999)Gram-positive sepsis. Mechanisms and differences from gram-negative sepsis *Infect Dis Clin North Am Jun*;13(2):397-412. doi: 10.1016/s0891-5520(05)70082-9.

- Srzic, I., Neseck, V., Tunjic, D. (2022). Sepsis definition: what's new in the treatment guidelines. *Acta Clin Croat.* 61(S1):67-72. doi: 10.20471/acc.2022.61.s1.11.
- Traeger, T. et.al. (2010). y otros. «Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) - a Standardized Model for Polymicrobial Abdominal Sepsis.» *J. Vis Exp*, n° e2299 : 1-5.
- Wiersinga, J. (2011). Current insights in sepsis: from pathogenesis to new treatment targets.» *Current opinion on Critical Care*, n° 17 : 480-486.
- Xiao, H., Javed, S., Remick, D. (2006)«Mechanisms of Mortality in Early and Late Sepsis.» *Infection and Immunity* 74, n° 9: 5227-5235.
- Yang, H., Yongjia F., Xiaoyi S., Teitelbaum, D. (2009). Enteral versus Parenteral Nutrition: Effect on Intestinal Barrier Function. *Ann N Y Acad Sci*, mayo : 1165: 338.
- Zantl, Niko, et. Al. (1998) Essential Role of Gamma Interferon in Survival of Colon Ascendens Stent Peritonitis, a Novel Murine Model of Abdominal Sepsis.. *Infection and Immunity* 66, n° 5 :2300-2309.

Mecanismos moleculares y genéticos de la degradación de xenobióticos por *Pseudomonas extremaustralis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*²⁷

Sandra Mónica Estupiñán Torres²⁸
María Angie Beltrán Duque²⁹
Silvio Alejandro López Pazos³⁰

Resumen

Los xenobióticos son compuestos químicos sintéticos, entre los que se incluyen fertilizantes, pesticidas, colorantes, dioxinas, bifenilos policlorados e hidrocarburos poliaromáticos. Estos compuestos, al no ser naturales, contaminan el medio ambiente y pueden tener efectos perjudiciales en los seres vivos, ya que no se integran en las rutas metabólicas celulares y son recalcitrantes. En la agricultura, se utilizan diversos xenobióticos como aldrín, dieldrín, endrín, clordano, heptaclorohexaclorobenceno, mirex, toxafeno, glifosato y DDT. Se han descubierto microorganismos, como ciertas especies de *Pseudomonas* y *Bacillus*, que poseen la capacidad de degradar estos xenobióticos, lo que les confiere un gran potencial para la biodegradación y la biorremediación. Bacterias específicas, como *P. extremeustralis*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis*, contienen enzimas con aplicaciones biotecnológicas. Sorprendentemente, hasta el 50% de las proteínas en su genoma se consideran de función desconocida, lo que sugiere un

²⁷ **Proyecto:** Actividad biocontroladora de patógenos mediante bacterias asociadas a ambientes extremos y su relación con bacteriocinas. Grupo Calidad de Aguas.

²⁸ , MSc. Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Docente, sestupinan@unicolmayor.edu.co

²⁹ Bacterióloga y Laboratorista Clínico de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Universidad Antonio Nariño, joven investigador, marian.beltran@outlook.com

³⁰ PhD. Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, Universidad Antonio Nariño, Docente, alejandrolopezpazos@uan.edu.co

papel crucial en los procesos de adaptación. Estos microorganismos se presentan como una herramienta poderosa en la lucha contra la contaminación por xenobióticos y en la restauración de ecosistemas dañados. Han demostrado su capacidad para descomponer compuestos dañinos para el medio ambiente y la salud humana, abordando una amplia gama de contaminantes químicos, desde hidrocarburos hasta productos farmacéuticos y químicos industriales. Su adaptabilidad a condiciones extremas, su capacidad para formar biopelículas y secretar enzimas, reduce la necesidad de productos químicos tóxicos y métodos de limpieza costosos, promoviendo así prácticas más sostenibles en la gestión de la contaminación.

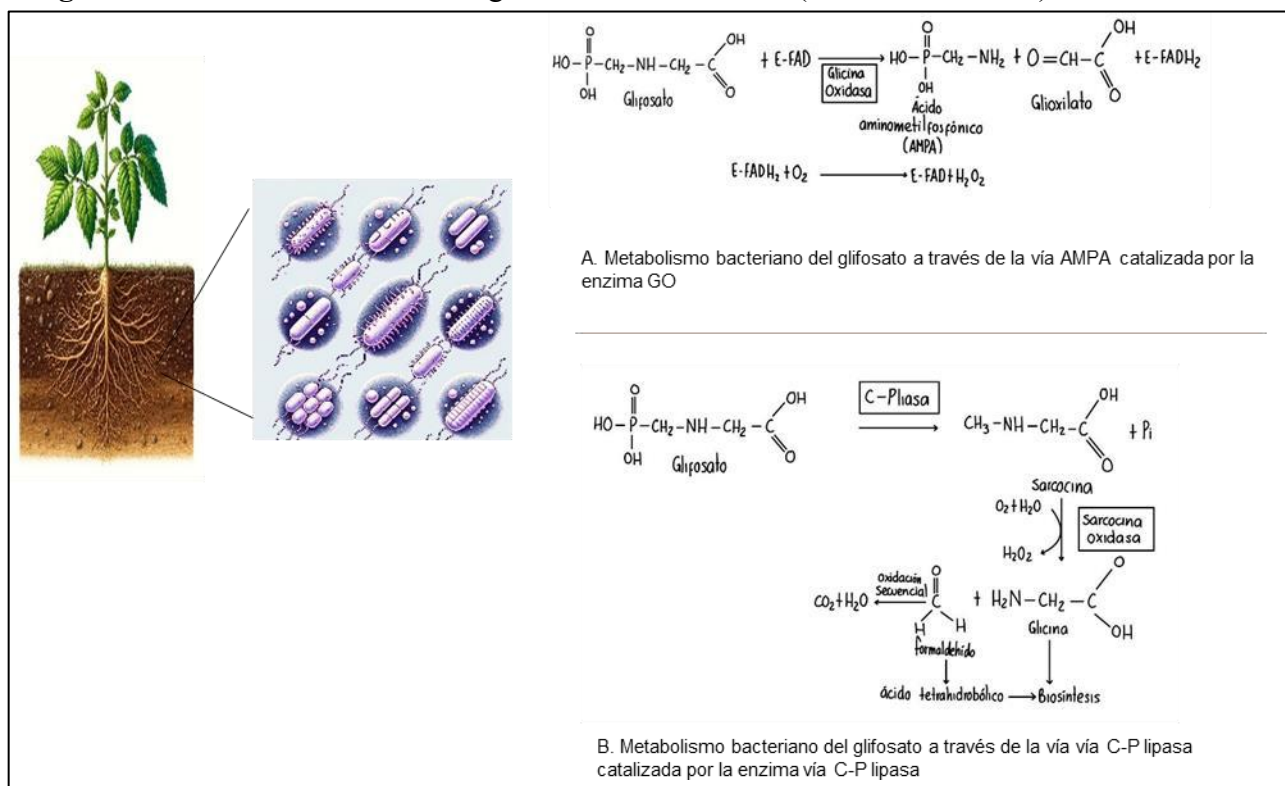
Introducción

A los compuestos sintéticos químicos que no son naturales y vienen de fuentes externas al ambiente, se llaman xenobióticos, estos pueden ser fertilizantes químicos, pesticidas, tintes, dioxinas, bifenilos policlorados (PCB), e hidrocarburos poliaromáticos que generan efectos secundarios sobre la biota, puesto que no pueden ser reconocidos por los procesos bioquímicos en plantas y microorganismos, haciéndolos resistentes a la degradación (Singh A., 2016) (Okagu, 2023). Para los años 70's, en Colombia se hizo uso de plaguicidas con contaminantes orgánicos persistentes (COP), como aldrin, dieldrina, endrina, Clordano, Heptacloro-Hexaclorobenceno, Mirex, Toxafeno y DDT para cultivos como el maíz, arroz, papa, y algodón, los cuales pueden estar en el suelo por años (Kirichuk, 2023) . En las regiones agrícolas de Colombia, como la Caribe y Pacífica, los cultivos de banano, arroz, pastos, algodón, maíz y frutales generan residuos de pesticidas que son lixiviados a los ríos Magdalena y al Cauca, lo que ocasiona contaminación persistente del compuesto orgánico (Panorama de biorremediación en Colombia) (Rosso-Pinto Mauricio, 2023). Según la estadística de “Comercialización de plaguicidas químicos de uso agrícola 2013- ICA”, los cinco plaguicidas más consumidos en Colombia son el fungicida Mancozeb (20.379 ton), los herbicidas 2,4 Diclorofenoxiacético (12.797 ton) y glifosato (9.605 ton); y los insecticidas imidacloprid (5920 ton) y clorpirifos (4421 ton), siendo estos causantes de contaminación del suelo generando infertilidad y toxicidad debido a su bioacumulación (Gomez LE, 2017).

Existe una variedad de microorganismos capaces de degradar compuestos xenobióticos agrícolas, algunos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp (Garcia Birolli Willian, 2022) (Barman, 2024). Los microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas* sp, son bacilos Gram negativos y generalmente móviles, se adaptan a diferentes condiciones ambientales, que para otros microorganismos serían desfavorables para su crecimiento (Ramasamy Kesava P, 2023). Lo anterior, gracias a

su actividad enzimática e información genética, confirmando así que este grupo de microorganismos son promotores de la biodegradación y biorremediación (Satapute P, 2019). *B. subtilis* y *B. thuringiensis* son bacilos Gram positivos, un sistema modelo para diferenciación y desarrollo celular (Stülke J, 2023) (Almeida AL, Bacillus thuringiensis : mecanismo de acción, resistencia y nuevas aplicaciones: una revisión, 2016). Su interacción directa con el ambiente se produce gracias a producción de enzimas que degradan sustratos derivados de la fauna, flora y compuestos orgánicos como hidrocarburos (Errington J., 2017) (Almeida AL, Bacillus thuringiensis : mecanismo de acción, resistencia y nuevas aplicaciones: una revisión, 2016) (Barman, 2024). Por medio de la degradación microbiana, el glifosato puede ser usado como fuente de C por medio de la vía ácido aminometilfosfónico (AMPA) (Chen Yongsheng, 2022). También el glifosato puede ser usado como fuente de fósforo, gracias al sistema enzimático de la vía C-P liasa (Hove-Jensen B, 2014.).

Imagen 1. Metabolismo bacteriano del glifosato. Modificado de (Sviridov AV, 2014) .



Las proteínas son moléculas que cumplen funciones específicas, incluyendo biorremediación enzimática (Morris R, 2022). Cuando se habla de proteínas hipotéticas, se define como una proteína que al parecer se expresa a partir de un marco de lectura

abierto, pero no hay evidencia experimental de su traducción, es por lo anterior que no ha sido caracterizada, pero es probable que alguna de estas proteínas hipotéticas puedan realizar funciones biológicas que aún no se conocen, utilizando métodos de predicción funcional se busca la presencia de señales de orientación subcelular y la presencia de dominios caracterizados (Desler C, 2009) (Ijaq J, 2019). Los dominios de función desconocida (DUF), son un gran conjunto de familias que no incluyen ninguna proteína de función conocida, y no se sabe si estas familias representan un dominio de proteínas o muchos (Lv P, 2023) (Bateman A, 2010). Una de las formas para determinar la función de un dominio no caracterizado, es identificar la similitud con un dominio de función conocida por comparación de secuencias o por análisis estructural; otra forma es el uso del contexto genómico para identificar computacionalmente la función por medio de bases de datos como Pfam (Finn RD 1, 2014) y SUPERFAMILY 1.75 (Gough J, 2001); y por último por biología molecular o bioquímica (Bateman A, 2010). Las proteínas huérfanas son enzimas que no tienen una proteína o secuencia de genes coincidentes (Hanson AD, 2009). Los genes se pueden asociar por la proximidad de los mismos en el genoma, donde los procariontes tienen genes organizados en operones, también se pueden transcribir la proteína desde la región promotora (Hanson AD, 2009) (Spiers AJ, 2023).

Cuando las bacterias se encuentran expuestas a un estrés ambiental puede ocurrir la expresión de las proteínas de choque térmico, las cuales están encargadas de mediar el plegamiento de las cadenas polipeptídicas, previniendo la agregación de polipéptidos (FT, 2010) (Iyengar BR, 2022). El sistema de chaperonina GroEL/GroES es quizá uno de los sistemas de chaperona más estudiados a nivel del mecanismo molecular, tenido un peso de 60 kDa y el cofactor 10 kDa (Weiss C, 2016) (Iyengar BR, 2022).

Comprendiendo la biorremediación de xenobióticos por *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp

***Pseudomonas* sp.**

Las concentraciones de xenobióticos en el suelo, pueden causar la bioacumulación cuando este compuesto pasa a través de la cadena alimentaria de un nivel trófico a otro (Okagu, 2023). En las plantas se absorbe por raíz y pueden bloquear procesos bioquímicos como el transporte de iones, nutrientes, inactivar enzimas, alterar la integridad de la membrana celular y de los orgánulos (Singh A., 2016) (Okagu, 2023). La transformación biológica de los compuestos orgánicos por microorganismos, es llevada a cabo gracias a diferentes tipos de enzimas y ácidos orgánicos que actúan sobre

los compuestos xenobióticos y los degradan en formas más simples (Okagu, 2023). Algunas bacterias del género *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.*, tienen la capacidad de cumplir una función degradadora de xenobióticos incluyendo compuestos aromáticos policíclicos, fertilizantes y pesticidas (Singh A., 2016) (Barman, 2024).

Las proteínas tienen diferentes funciones, ya sean enzimáticas, de transporte o estructurales, las cuales son un producto genético que interactúa para promover la función estructural y el crecimiento celular (Desler C, 2009) (Morris R, 2022). Dentro de la secuenciación de genomas de organismos, hasta el 50% de los genes dentro de un genoma se denominan como “hipotéticos” o “desconocidos” (Desler C, 2009), situación que limita la comprensión del papel que pueden desempeñar estas proteínas hipotéticas en la supervivencia y en relación con las diferentes condiciones medio ambientales (Mulder, 2012). Se debe tener en cuenta que cuando la bacteria se encuentra expuesta a un estrés ambiental puede expresar proteínas de choque térmico, las cuales previenen la agregación de polipéptidos ya que se encargan de mediar su plegamiento (FT, 2010). Específicamente para *P. extremaustralis*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis*, algunas de estas proteínas podrían ser la respuesta al estrés por xenobióticos.

Las investigaciones en suelos polares, evidencian que el derrame de un hidrocarburo aumenta el número de bacterias biorremediadoras, incluyendo al género *Pseudomonas sp.* La tasa de degradación de hidrocarburos *in situ* es lenta debido a su persistencia, tales como alcanos ligeros y aromáticos que se encuentren en el subsuelo, los cuales no están expuestos a la evaporación y fotooxidación; de manera que la actividad de bacterias autóctona es limitada para los degradadores de hidrocarburos, ya que las condiciones ambientales como la temperatura baja o fluctuante, la alcalinidad, la humedad, la limitación de nutrientes y la inhibición ejercida por el hidrocarburo, son desfavorables (Aislabie J, 2006). La temperatura es una condición ambiental que influye en la biorremediación, a una temperatura baja aumenta la viscosidad del aceite y la volatilización del compuesto lo que produce un aumento del tiempo para la degradación del hidrocarburo, sin indicar un cese de la actividad biodegradadora incluso a temperaturas bajo cero (Aislabie J, 2006) (Qing Wang, 2022). En relación con las condiciones ambientales se considera que el nitrógeno es el principal nutriente limitante, puesto que para la degradación de hidrocarburos se dispone del nitrógeno (N) y fósforo (P) que se encuentran en el medio, evidenciándose en *P. putida*, *Acinetobacter sp.* y *Rhodococcus sp.*, las cuales tuvieron la capacidad de crecer en una gama de alcanos a partir de hexano (6C) a través de eicosano (20 C) y pristano compuesto isoprenoide (2,6,10,14-tetrametil-entadecano) (Sun Y, 2021). El nivel óptimo de N para la biodegradación del hidrocarburo depende del tipo de suelo (Aislabie J, 2006)

(Ławniczak Ł, 2020). Los genes homólogos de *P. putida* (*Pp alkB*), *Acinetobacter sp.* (*Ac alkM*) y *Rhodococcus sp.* (*Rh alkB1* y *Rh alkB2*) codifican el sistema hidroxilasa alcano que comprende una monooxigenasa alcano-integral de membrana y rubredoxina soluble y rubredoxina reductasa los cuales están involucrados en la biodegradación del hidrocarburo (Aislabie J, 2006) (Gouthami, 2023).

Javaid et al. (Javaid MK, 2016) señalan que *Pseudomonas sp.* puede degradar endosulfán utilizando un medio modificado con glucosa y atrazina, tomándolos como fuente de carbono (C) (Javaid MK, 2016). El endosulfán se metaboliza en sulfato de endosulfán, que es el único producto del metabolismo del endosulfán por acción bacteriana, donde el endosulfán logró degradarse en 50% a los tres días, gracias a que las enzimas para la degradación de pesticidas organoclorados son principalmente enzimas de deshidrocloración, enzimas hidrolíticas y deshidrogenasas, las cuales están relacionadas con los genes de la familia *Lin* (Javaid MK, 2016).

En Australia, se realizó un muestreo de cinco granjas de caña de azúcar con un antecedente de utilizar pesticida clorpirifos (CP) (Rayu S, 2017). Se utilizó el medio MSM complementado con clorpirifos 20 mg/L y modificado con N, P y C, se obtuvo como resultado que *Pseudomonas sp.* tuvo mayor degradación en los medios de MSM sin C (+ N/ + P /- C) en el cual utilizo 90% de clorpirifos (Rayu S, 2017).

El género *Pseudomonas sp.*, fue descrito por primera vez por Migula en 1894 (López NI, 2009). *P. extremaustralis*, es una bacteria aislada del extremo sur de la Antártida, es un bacilo Gram negativo, no formador de esporas, móvil, con metabolismo oxidativo evidenciado en oxidasa y catalasa positivo (López NI, 2009). Su crecimiento se da a una temperatura de 4 a 37°C, con morfología circular, lisa y no pigmentada (López NI, 2009).

Las observaciones relacionadas con la biorremediación de hidrocarburos, indican que se necesitan microorganismos con una actividad enzimática que les permita adaptarse a la condición adversa de contaminación y así sobrevivir (Raiger Iustman LJ, 2015). Es por lo anterior que la supervivencia de *P. extremaustralis* está asociada a la producción de polihidroxicanoatos (PHAs) cuando se encuentra en exposición a hidrocarburos (Raiger Iustman LJ, 2015). En el bioensayo realizado se encontró que *P. extremaustralis* crece en medio MSM con 5% de diesel (C₁₀H₂₀) asociándose este crecimiento a la presencia del gen *alkB* que codifica para monooxigenasa, degradando 27.3 ± 6.0% de diésel (Raiger Iustman LJ, 2015).

Cabe resaltar que metabolizar compuestos aromáticos por parte de microorganismos está relacionado con entornos pobres en nutrientes (Raiger Iustman LJ, 2015). La degradación de compuestos complejos está ligado con el metabolismo del ácido ferúlico, el cual es uno de los ácidos hidroxicinámicos más comunes presentes en

la lignina, donde *P. extremaustralis* presenta todos los genes de la ruta para el metabolismo del ácido ferúlico en el cual los genes de porina específica para el hidroxicinamato (*orpD*) y transportador de hidroxicinamato (*mhpT*) son claves para la captación de derivados del ácido cinámico, observados solo en *P. extremaustralis*, *P. fluorescens* SBW25 y *P. syringae* pv. *syringae* B782a (Raiger Lustman LJ, 2015). Además, una segunda copia de *orpD* solo se encontró en *P. extremaustralis*. Para la conversión de ácido ferúlico en ácido vanílico en el género *Pseudomonas* sp. se han descrito dos vías, en donde una de estas vías transforma el feruloilCoA en ácido vanílico mediante una acil-CoA-deshidrogenasa y una enzima b-cetotiolasa, y la segunda vía tiene la vanilina como intermediario que conduce al ácido vanílico por la enzima Vanilin deshidrogenasa, ambas rutas se encontraron en *P. extremaustralis* (Raiger Lustman LJ, 2015).

Las especies de *Pseudomonas* sp. son metabólicamente versátiles y se puede obtener energía de diferentes vías centrales y secundarias, como la ruta Entner-Doudoroff, la oxidación periplasmática de la glucosa (que involucra a los genes *gcd* y *gad*), la oxidación del etanol (incluidos los genes *exaA*, *exaB* y *exaC*), la fermentación de piruvato (incluyendo *ack*, *pta*, *adhA* y *ldhA*) y arginina (incluyendo los genes *ldhA* y *arcDABC*) (Tribelli PM, 2015). En este estudio para determinar la capacidad de *P. extremaustralis* para crecer utilizando etanol como fuente de C se llevó a cabo en agar LB, previamente modificado con etanol al 0.5% (v/v) para acumular así PHA y para estimar cuantitativamente la actividad del alcohol deshidrogenasa se utilizó el ensayo de p-rosanilina, y se determinó el espectro de absorción (Tribelli PM, 2015). Los genes involucrados en el metabolismo de oxidación del etanol son genes *exaA* que codifica un etanol deshidrogenasa dependiente de una quinona pirroloquinolina (PQQ), *exaC* que codifica la enzima aldehído deshidrogenasa, y *exaB* codifica c550 citocromo, así como *erbR* que expresa un regulador transcripcional relacionado con oxidación el etanol en el género *Pseudomonas* sp. En *P. extremaustralis* las secuencias de aminoácidos de *ExaA1* y *ExaA2* presentaron entre ellas el 51% de identidad y el 78% de similitud (Tribelli PM, 2015). El gen de codificación *erbR* se encuentra en la misma zona genómica que *exaA*, *exaB* y *exaC*, separados por nueve ORFs putativos (Tribelli PM, 2015).

López et al. (López G, 2017) realizaron un análisis experimental para determinar la actividad lipolítica de *P. extremaustralis* USBA-GBX-515 (ID CMPUJ U515), evaluando el crecimiento en trioleína, tributirina, Tween 80, aceite de oliva y tricaprilina, usándolos como fuente de C durante 42 horas a 30°C. Se determinó la actividad lipolítica máxima 2.0 UL $\mu\text{mol/L/min}$ a las 15 horas al final de la fase exponencial (López G, 2017). El análisis genómico identificó dos genes; uno de ellos es *lip515A* relacionado con una lipasa de triacilglicerol, y *est515A* una lipasa de

carboxilesterasa (López G, 2017). En estos genes se identifica una α/β hidrolasa conservada que es común en las enzimas lipolíticas importante para el metabolismo de ácidos grasos y lípidos. El gen *lip515A* mostró una identidad del 49% (valor E $3e-80$ con una lipasa de triacilglicerol de *P. fragi* IFO-12049 (López G, 2017). Para los genes de PHA, se determinó que se encuentra presente el operón *phaABC*, conteniendo la PHA sintasa (*phaC*), β -cetotilasa (*phaA*) y acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADP (*phaB*) (López G, 2017).

Es necesario recalcar que Morita denominó los microorganismos que habitan en ambientes fríos como psicrófilos, es decir, que su crecimiento óptimo es a temperaturas inferiores a 15°C (NI, 2018). Sin embargo, su metabolismo se ve alterado por las bajas temperaturas, aumentando el estrés oxidativo a causa de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (NI, 2018). Por medio del análisis del transcriptoma del ARN de *P. extremaustralis*, haciendo uso de la tecnología deep-sequencing, colocando la cepa en estrés con octanoato de sodio en medio LB favoreciendo así la acumulación de PHA a 8°C y 30°C (Tribelli PM, 2015). Se identificaron diferentes genes, entre ellos *FLG*, *flgJH*, *flgK*, *flgL*, *fleQ*, *FliF*, *FliG*, *FLIM*, *FlhA* que codifican para motilidad, y fueron reprimidos a bajas temperaturas, incluso algunas chaperonas de choque térmico como *dnaJ* y *dnaK* fueron reprimidos a 8°C (NI, 2018). Pero el gen principal *cspA*, que codifica para las proteínas de choque frío, aumentó su transcripción a 8°C permitiendo así la bacteria adaptarse a las condiciones de baja temperatura (Tribelli PM, 2015).

Una de las condiciones para que los microorganismos tengan la capacidad de biodegradar un contaminante es que se encuentre disponible (Vásquez F, 2018). El diésel es un compuesto alifático que, por la falta de grupos funcionales y baja solubilidad en agua, no permite que sea utilizado por el microorganismo (Vásquez F, 2018). Sin embargo, la adaptabilidad de algunos microorganismos como *P. extremaustralis* después de realizar la secuenciación de ARN en cultivos aeróbicos y microaerófilos, sobre expresó el gen *alkB* en microaerobiosis, sin estar expuesto a un hidrocarburo (Vásquez F, 2018). También se determinó que este microorganismo solo utiliza el diésel, al expresar el gen *alkB* en microaerobiosis (Vásquez F, 2018). Teniendo en cuenta lo anterior, los microorganismos que permitan adaptarse son de interés para la industria biotecnológica puesto que se pueden utilizar en diferentes procesos de biorremediación (Vásquez F, 2018).

Bacillus sp

Huang et al. (Huang Y, 2018) identifican diferentes microorganismos capaces de degradar pesticidas, donde se menciona al género *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.* Estos microorganismos tienen la capacidad de adaptarse e inducir mutaciones que permiten

degradar el pesticida, es por ello que se menciona que el género *Pseudomonas sp.* degrada aldrin (C₁₂ H₈ Cl₆/ (1R,2R,3R,6S,7S,8S) -1,8,9,10,11,11-hexaclorotetraciclo [6.2.1.1 3,6 .0 2,7] dodeca-4, 9-dieno), clorpirifos (C₉ H₁₁ Cl₃ N O₃ P S/ dietoxi-sulfanilideno- (3,5,6-tricloropiridin-2-il) oxi-λ⁵ -fosfano), coumaphos (C₁₄ H₁₆ Cl O₅ P S/ 3-cloro-7-dietoxifosfinotioiloxi-4-metilcromen-2-ona), o,o-DDT (C₁₄ H₉ Cl₅/ 1-cloro-2- [2,2,2-tricloro-1- (2-clorofenil) etil] benceno), diazinon (C₁₂ H₂₁ N₂ O₃ P S/ dietoxi- (6-metil-2-propan-2-ilpirimidin-4-il) oxi-sulfanilideno-λ⁵ -fosfano), endosulfan (C₉H₆Cl₆O₃S/ 1,9,10,11,12,12-hexacloro-4,6-dioxa-5λ⁴ - tiatriciclo [7.2.1.0^{2,8}] dodec-10-eno 5 óxidos), endrin (C₁₂ H₈Cl₆O/ 3,4,5,6,13,13-hexacloro-10-oxapentaciclo [6.3.1.1 ^{3,6} .0 ^{2,7}.0^{9,11}] tridec-4-eno), hexaclorociclohexano (C₆H₆Cl₆/1,1,2,3,3,4 hexaclorociclohexano), metil paratión (C₈H₁₀NO₅PS/ dimetoxi- (4-nitrofenoxi) -sulfanilideno-λ⁵ -fosfano), monocrotofos (C₇ H₁₄ NO₅ P/ Dimetil [(E) -4-(metilamino) -4-oxobut-2-en-2-il] fosfato), paratión (C₁₀ H₁₄ NO₅ PS/ dietoxi- (4-nitrofenoxi) -sulfanilideno-λ⁵ -fosfano). El género *Bacillus sp.* tiene la capacidad de degradar Clorpirifos, coumafos, DDT, diazinón, dieldrina, endosulfán, endrina, glifosato (C₃H₈NO₅P/ Ácido 2- (fosfonometilamino) acético), metil paratión, monocrotofos, paratión, e hidrocarburos policíclicos (Huang Y, 2018). El mecanismo por el cual los microorganismos tienen la capacidad de degradar el pesticida es enzimático, donde el compuesto se degrada o se transforma en moléculas más pequeñas no tóxicas o menos tóxicas (Huang Y, 2018). Los pesticidas se degradan por medio de expresión de genes plasmídicos y genes del cromosoma de la bacteria (Huang Y, 2018). La cepa ADP de *Pseudomonas sp.* tomó la atrazina como única fuente de C utilizando tres enzimas (Huang Y, 2018). Primero se cataliza la reacción de la dechloración por hidrólisis gracias a la enzima AtzA, luego la enzima fue AtzB, que cataliza la deshidrocloración de la hidroxiatrazina para producir N-isopropil cianúrica amida, y por último la enzima AtzC, que cataliza el ácido cianúrico y la isopropilamina formados por la N-isopropil cianúrica amida, mineralizando el pesticida a CO₂ y NH₃ (Huang Y, 2018).

En los suelos de Kirguistán, se realizó un estudio para determinar qué microorganismos ayudan en biorremediación de suelos que fueron contaminados por compuestos como el Aldrin (Doolotkeldieva T, 2018). Bacterias del género *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.*, que presentaron los genes del citocromo P450 participaron en el proceso de degradación del compuesto xenobióticos Aldrin encontrado en altas concentraciones en los suelos de estudio (Doolotkeldieva T, 2018). De las bacterias aisladas, capaces de degradar los pesticidas, 23% pertenecían al género *Pseudomonas* y 21% al género *Bacillus sp.* (Doolotkeldieva T, 2018).

El compuesto tóxico y recalcitrante 4-cloro-2-nitrofenol (4C2NP) es utilizado para la fabricación de medicamentos, pesticidas, colorantes y otros productos químicos (PK, 2012). La primera evidencia de degradación microbiana de este compuesto se dio gracias a una bacteria genéticamente modificada que fue *Pseudomonas sp.* N31 que degradó el 4C2NP a través de la formación de clorocatecol y la liberación de nitrito y cloruro de iones. *B. subtilis* RKJ 700 se aisló de una muestra de suelo recolectada en un sitio contaminado con pesticidas en Punjab, India (PK, 2012), la cual decoloró el 4C2NP (0,5 mM / 1.0mM / 1.5 mM / 2.0 mM) solo en presencia de una fuente de C adicional (glucosa 10mM) en medio MSM (PK, 2012).

La decoloración se controló midiendo la absorbancia del sobrenadante a 430 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible (PK, 2012). *B. subtilis* RKJ 700 fue capaz de decolorar 4C2NP hasta una concentración de 1.5 mM a través de la transformación de 4C2NP, el cual se redujo a 4C2AP (4-cloro-2-aminofenol) que se acetiló aún más en 4C2AAP (4-cloro-2-acetaminofenol) (PK, 2012). El producto acetilado 4C2AAP se transformó en 5C2MBZ (5-cloro-2-metilbenzoxazol), que se detectó como un producto final en la ruta de biotransformación de 4C2NP. La división directa del anillo de 4C2AP también se informó y catalizó por la enzima 2-aminofenol-1,6-dioxigenasa, que es un mecanismo clave cuando las bacterias utilizan un compuesto nitroaromático clorado como única fuente de C y energía, y se formó 4C2AP como un intermedio (PK, 2012). *B. subtilis* RKJ 700 no utilizó 4C2NP como la única fuente de C y energía, por lo tanto, la división directa a 4C2AP puede no estar involucrada en la ruta de degradación de 4C2NP para la cepa RKJ 700 (PK, 2012).

Por otra parte, los microorganismos que no han sido manipulados genéticamente son más utilizados en las tecnologías de biorremediación (Joo, 2013). Muchos organismos que están expuestos a una sustancia tóxica, son capaces de descomponer estos compuestos en sustancias inocuas, obteniendo de ellas nutrientes y energía (Joo, 2013). En la industria petrolera se utilizan emulsionantes de origen químico, el cual puede causar una contaminación secundaria y problemas tóxicos por su uso excesivo. Es por lo anterior que se ha propuesto el uso de biosurfactantes, los cuales son producidos por microorganismos teniendo las características de adherirse a las superficies celulares, o siendo secretadas extracelularmente, permitiendo así reducir la tensión superficial e interface en soluciones acuosas y las mezclas de hidrocarburos, gracias a las propiedades antipáticas (Joo, 2013).

Estos biosurfactantes, se han utilizado en contaminantes orgánicos, derrames de petróleo, lugares contaminados por hidrocarburos y metales pesados (Joo, 2013). Además, las ventajas del uso de biosurfactantes están relacionadas con su fácil degradación por los microorganismos, mantienen su eficacia frente a variaciones en las

condiciones ambientales como el pH, la temperatura y la fuerza iónica, además de tener una baja toxicidad (Joo, 2013). En relación con lo anterior, se considera que *B. subtilis* es una fuente de producción de biosurfactantes debido a su ausencia de patogenicidad y alta actividad superficial, donde la producción de estos, más la relación con microorganismos nativos mejora la biorremediación de suelos contaminados por petróleo (Joo, 2013).

Sakthipriya N et al. (Sakthipriya N, 2015) investigaron la degradación del aceite crudo utilizando microorganismos productores de biotensoactivos, puesto que este biosurfactante desarrolla la capacidad de las células microbianas a crecer sobre los sustratos, que sería el hidrocarburo hidrófobo para aumentar su biodisponibilidad, donde la bacteria *B. subtilis*, presenta características ideales como potencial microorganismo para tratamiento de derrames de aceite, estabilidad del biotensoactivo, reducción de viscosidad y alta velocidad de degradación (Sakthipriya N, 2015). El microorganismo *B. subtilis* YB7, aislado de la India en un sitio de derrame por crudo, fue utilizado para determinar su capacidad de degradar el crudo tomando 1 ml de la alícuota con un 2% (V/V) de aceite crudo ceroso con un 99% de pureza en un medio líquido a temperatura ambiente (Sakthipriya N, 2015). La degradación del aceite crudo y la reducción de la viscosidad se observaron en concentraciones de 80% y 60%, respectivamente, en 10 días (Sakthipriya N, 2015).

Montagnolli RN et al. (Montagnolli RN) realizaron bioensayos en caldo Bushnell Haas (BH) para analizar la biodegradación del aceite diesel y keroseno ($C_{12}H_{26}$) añadiendo biotensoactivos a una concentración de 1 g/L para mejorar el proceso de biodegradación (Montagnolli RN). La velocidad máxima de degradación se dio a los 400 días, ya que la biorremediación implica varias etapas: adaptación, degradación, y biodegradación microbiana (Montagnolli RN).

Xiao et al. (Xiao Y, 2015) identificaron que la cepa *B. subtilis* BSF01 utiliza los insecticidas piretroides como única fuente de C, degradando en un 89.4% la beta-cipermetrina (beta-cp), en 9.2% a la cipermetrina, 86.9% para deltametrina, 86.5% a beta-ciflutrina, y 76.8% con cihalotrina, a una concentración de 50 mg/L en 7 días (Xiao Y, 2015). Beta-cp se metaboliza en primer lugar por hidrólisis de su enlace éster gracias a una carboxilesterasa para producir 3-(2,2-dicloroetenil)-2,2-imetilciclopropanocarboxilato y α -hidroxi-3-henoxibencenoacetnitrilo (Xiao Y, 2015). El α -hidroxi-3-fenoxibencenoacetnitrilo fue inestable y se transformó espontáneamente para producir 3-henoxibenzaldehído (Xiao Y, 2015).

Safdari et al. (Safdari, 2017) confirmaron que *P. aeruginosa* y *B. subtilis* son competentes para la eliminación de hidrocarburos de petróleo, las cuales fueron aisladas de una refinería industrial en Irán, siendo identificadas por pruebas bioquímicas y

secuenciación del gen 16S ARNr (Safdari, 2017). Se realizan los bioensayos en 50 ml de MSM y 2,3,4 y 5% de diesel como única fuente de C. Se evidencia que la degradación disminuye cuando se aumenta de un 2 a 5 % la concentración del contaminante diésel, además de mostrar mayor eficacia de biodegradación a los 20 días (Safdari, 2017). La cepa aislada del suelo identificada como *P. aeruginosa* mostro un 62% de capacidad para biodegradar el diesel y *B. subtilis* un 61%. Se ha identificado que existe un consorcio bacteriano en los lugares contaminados por hidrocarburos, pero factores ambientales como nutrientes y biodisponibilidad limitan la degradación; es por ello que se ha utilizado la fertilización como método para ajustar la relación C:N:O llevando una eliminación de hidrocarburos en ambientes contaminados (Safdari, 2017). Según la estructura del contaminante los microorganismos tendrán la facilidad de utilizarlo como fuente de C y energía, es por ello, que se les facilita metabolizar alcanos y no hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y cicloalcanos (Safdari, 2017). La biorremediación de petróleo se puede llevar a cabo por diferentes métodos como atenuación natural, bioestimulación o bioaumentación (Safdari, 2017). Para dar inicio a una biorremediación *in situ* es importante tener en cuenta los limitantes, la capacidad metabólica de la comunidad microbiana autóctona y la biodisponibilidad del contaminante (Safdari, 2017).

Tabari et al. (Tabari, 2017) identifican que *B. subtilis* es un potencial biorremediador de hidrocarburos, demostrando degradación de alcanos alifáticos, siendo la mejor cepa para producir biosurfactantes, y es estable a cambios de temperatura, concentración de sal y pH entre 5 a 12, después de haber realizado un muestreo en suelos contaminados con aceite en Irán (Tabari, 2017). Para realizar el bioensayo de biorremediación se usó como fuente de C a hidrocarburos, tomando 50 ml de medio MSM y añadiendo 2% de alcanos alifáticos y un 1ml del inculo, colocándolo en agitación por 10 días (Tabari, 2017). En este estudio de determina de *B. subtilis* biodegrada alcanos alifáticos, además de mostrar una reducción de la tención superficial de 68 a 30 dinas/cm (Tabari, 2017).

Por otro lado, para la biodegradación de estos compuestos, existen bacterias aerobias que utilizan enzimas como dioxigenasas y las deshidrogenasas (Abdelhaleem HAR, 2019). Se identificó que *B. subtilis* posee alta actividad de biodegradación, la cual puede tomar hidrocarburos policíclicos como única fuente de C y energía (Abdelhaleem HAR, 2019). El estudio se basó en tomar 10 muestras de lodo en el suroeste de Egipto, identificando por 16S ARNr a las cepas *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mojavensis* y *B. subtilis*, las cuales fueron analizadas para degradación de acenafteno, antraceno, dibenzoantraceno, benzopireno, naftaleno, fenantreno y pireno. *B. subtilis* mostró mayor actividad de catecol 1, 2 dioxigenasa en MSM complementado con antraceno biodegradando 99%

y alfa-naftaleno degradando 41% a los 10 días, y a los 28 días Benzopireno, con una eficiencia del 84.66% (Abdelhaleem HAR, 2019). Por medio de PCR se identifica el gen *catA*, el cual codifica para catecol dioxigenasa (Abdelhaleem HAR, 2019).

Shi L et al. 2016 (Shi L, 2016) observan que en *B. subtilis* la proteína DnaK estaba fosforilada tanto en condiciones de crecimiento exponencial como de estrés/inanición, es por esto que en este estudio de evidencia que es debido a que DnaK se fosforila en el residuo Y601 por una proteína bacteriana tirosina quinasa PtkA, y se desfosforila por la fosfotirosina-proteína fosfatasa PtpZ, además, evidencia que esta chaperona ayuda en supervivencia a choque térmico de *B. subtilis* (Shi L, 2016). La proteína PtkA tiene actividad celular en proteínas de unión a ADN monocatenarias reguladores de la transcripción, y algunas enzimas metabólicas; la proteína PtkA pertenece a la familia de las tirosina quinasa bacterianas (BY-quinasa), tienen una especificidad de sustrato generando nuevos pares quinasa-sustrato durante el proceso de evolución adaptativa (Shi L, 2016).

Seydlová G. et al. 2012 (Seydlová G, 2012), permiten evidenciar en su bioensayo el sistema de protección frente al estrés ambiental, después de colocar la cepa *B. subtilis* en estrés por etanol 3%, y después de exposición prolongada se evidencia expresión de las chaperonas DnaK y GroEL (Seydlová G, 2012).

Reddy et al. (Reddy, 2017) identifica que *B. thuringiensis* tiene la capacidad de degradar el pesticida quinalfos a una temperatura de 35°C y una concentración del pesticida de 200 ppm, tomándolo como única fuente de C (Reddy, 2017).

La degradación microbiana del insecticida fipronil por *B. thuringiensis*, después de su aislamiento en campos de cultivo de caña contaminados por este xenobiotico, se determina su capacidad biodegradadora de este compuesto a diferentes concentraciones 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 y 1.50mg/kg, los cuales fueron analizados los residuos de fipronil después de 28, 35, 35, 35 y 42 días identificándose que no hubo residuos de los metabolitos secundarios (Mandal K, 2013).

Chen et al. 2015 (Chen S, 2015), por medio de HPLC y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), se determina la degradación de cihalotrina por medio de una ruta metabólica completa para la degradación, donde el primer paso sería la hidrólisis del enlace éster, realizada por una carboxilesterasas, sin ningún producto acumulativo persistente gracias a la cepa *Bacillus thuringiensis* ZS-19 (Chen S, 2015). Esta cepa tomó el piretroide como fuente de C-N degradando completamente a las 72 horas. Además, este microorganismo también degrado fenpropatrina, deltametrina, beta-cipermetrina, ciflutrina y bifentrina (Chen S, 2015).

***Pseudomonas extremaustralis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*: Tres Actores Clave en la Biorremediación de Xenobióticos**

Pseudomonas extremaustralis

El género *Pseudomonas sp.* se caracteriza por su diversidad metabólica y el uso de pocos componentes nutricionales, puede utilizar diferentes compuestos orgánicos como única fuente de C y energía (Vásquez F, 2018). *P. extremaustralis* es altamente resistente al estrés, fue aislada de la Antártida, lado oeste de la península Antártica a 64°09'S, 60°57' W. Su adaptación para la colonización y supervivencia se ven relacionados con activación de diferentes vías metabólicas teniendo en cuenta las condiciones que se encuentran en ambientes naturales: disponibilidad de oxígeno, nutrientes, concentración de sales, y temperatura (Raiger Iustman LJ, 2015). Es una bacteria no patógena, resistente a los cambios de temperatura y al estrés oxidativo. Su metabolismo es no fermentativo y se evidencia un pigmento fluorescente en medio King B. Sus colonias son circulares, lisas y no pigmentadas. Es capaz de acumular grandes cantidades de polihidroxibutirato (PHB) un tipo de polihidroxialcanoatos (PHA), siendo estos un polímero de reserva de energía utilizado en casos de inanición, siendo una ventaja adaptativa (Catone MV, 2 de junio de 2014). *P. extremaustralis* CMPUJ U515 es la cepa aislada del Parque Natural Nacional de Nevados (Nevados NNP), un bacilo Gram negativo con un tamaño de 1.0–3.0 $\mu\text{m} \times 0.5\text{--}1 \mu\text{m}$, móvil gracias a la presencia de un solo flagelo, con crecimiento de 4° a 35°C, a pH de 7.0, no formador de esporas, catalasa y oxidasa positivos; y con actividad de fosfatasa alcalina y fosfohidrolasa. Esta cepa presenta susceptibilidad a imipenem, piperacilina, ticarcilina, meropenem, levofloxacina, ceftriaxona, cefoxitina y ceftazidima y resistencia a penicilina, colistina o polimixina y nitrofurantoína. Esta bacteria contiene 5665 genes de los cuales 5544 codifican para proteínas, clasificándose la mayoría en la categoría de aminoácidos y metabolismo (10.5%), transcripción (8.38%) y los mecanismos de transducción de señales (7.3%) (López G, 2017).

Bacillus subtilis

Este organismo fue una de las primeras bacterias estudiadas, y fue nombrado *Vibrio subtilis* en 1835 y renombrado *B. subtilis* en 1872 (GenBank). Es una especie ubicua, siendo un bacilo Gram positivo móvil, con crecimiento hasta los 70°C, de 0,5 a 2,5 $\mu\text{m} \times 1,2\text{--}10 \mu\text{m}$, produce endosporas termoestables a factores físicos como desecación, radiación y desinfectantes químicos, produce enzimas hidrolíticas extracelulares que descomponen polisacáridos, permitiendo que este microorganismo emplee estos productos como fuente de C y energía. Además, produce antibióticos como bacitracina, polimixina, gramicidina y circulina siendo inhibidores de hongos y bacterias donde probablemente promueva el crecimiento vegetal (Earl AM, 2010) (JP,

2010). Se demostró que *B. subtilis* no es un aerobio obligado ya que puede crecer anaerobiamente usando el nitrato en lugar del oxígeno como aceptor de electrones, gracias los genes que codifican una nitrato reductasa (Earl AM, 2010) (Barman, 2024).

Bacillus thuringiensis

En 1902 se identifica por primera vez que *B. thuringiensis* es un biocontrolador de *Bombyx mori* el cual estaba causando daños en la industria de la seda en Japón, donde posiblemente utiliza alguno de los mecanismos de acción teóricos, siendo el primero la formación de poros en la membrana celular causando así el desequilibrio osmótico y el segundo sería la activación de muerte celular dado la apertura de canales iónicos (Almeida AL, Bacillus thuringiensis: mechanism of action, resistance, and new applications: a review, 2016). Es un bacilo Gram positivo, móvil, con un tamaño entre 1 a 1.2 μm de ancho y 3 a 5 μm de largo, esporulador (Portela DD, 23 de mayo de 2013) siendo una de las características de *B. thuringiensis* puesto que generan una espora subapical al igual que uno o varios cuerpos parasporales compuestos de proteínas Cry o Cyt, los cuales tienen una actividad insecticida específica (Arrivillga, 2009) (Barman, 2024).

Mizuki et al., informan sobre una nueva categoría de proteínas de 90 kDa nombradas parasporinas las cuales no causan daño citopático a los invertebrados, pero muestra efecto tóxico a células alteradas por algún tipo de cáncer (Almeida AL, Bacillus thuringiensis : mecanismo de acción, resistencia y nuevas aplicaciones: una revisión, 2016).

El enigma de las Proteínas Hipotéticas: Un Vistazo al Mundo de las Moléculas Sin Función Conocida

Las proteínas son biomoléculas formadas por C, H, O y N. Los genomas de los organismos codifican una secuencia de aminoácidos específica dando lugar a proteínas sintetizadas en los ribosomas, que luego desempeñan funciones estructurales, enzimáticas, de transporte, movimiento, regulación y señalización (JM, 2017).

Determinar la función de una proteína permite tener mejor comprensión de los mecanismos de adaptación microbiana, pero todavía existe un número considerable de secuencias que no se pueden predecir puesto que entre el 30 y 40% de los genes no tienen una función conocida a nivel biológico y fisiológico (EV, 2004) (Shahbaaz M, 2013), a estas moléculas se les conoce como proteínas hipotéticas (Islam S, 2015) (Oliveira WL, 2018) (Ijaq J, 2019). Las proteínas hipotéticas son una fracción de genes en genomas secuenciados que se encuentran codificados en varios linajes filogenéticos

pero no ha sido caracterizado experimentalmente, ni en su funcionamiento o términos químicos (Lubec G, 2005).

Los dominios de función desconocida (DUF) son aquel grupo de proteínas que presentan un dominio funcional o estructural, pero no se ha demostrado experimentalmente en términos químicos, o que se pueda vincular a un gen (Lubec G, 2005). Se puede asignar su posible función basándose en homología de la correlación con proteínas conocidas, ya que muchas se encuentran en más de una especie bacteriana, con probabilidad de que si se traduce tenga una función y no que sea producto de un pseudogen (Ijaq J, 2019).

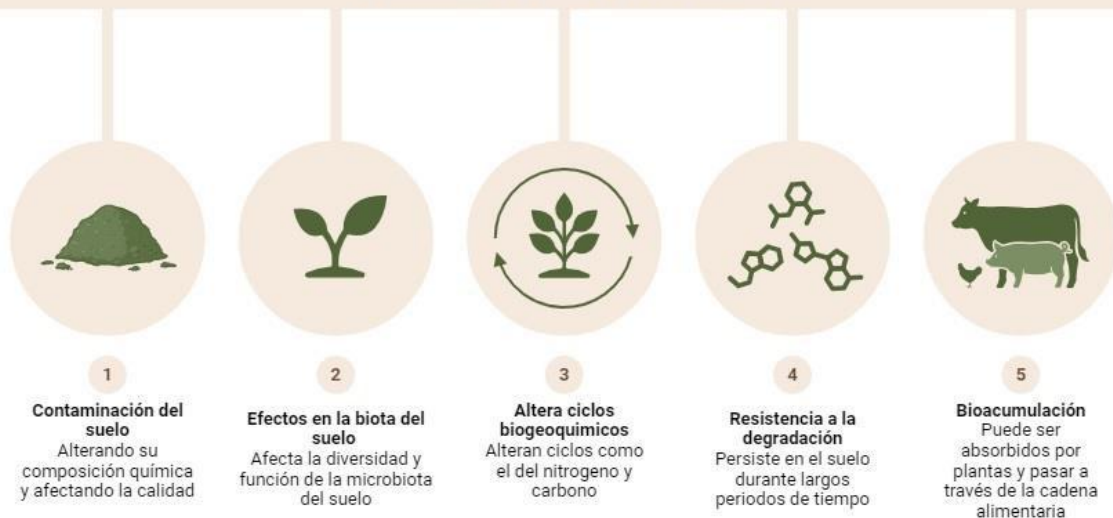
Las proteínas huérfanas (ORF), o proteínas huérfanas mal conservadas, están conformadas por al menos 50 residuos de aminoácidos, con baja probabilidad de que se expresen ya que son enzimas que no tienen una proteína o secuencia de genes que coincidan (Lubec G, 2005) (Hanson AD, 2009).

Xenobióticos en la agricultura.

La demanda agrícola y el cambio climático generan presión para el uso de fertilizantes químicos y pesticidas, permitiendo así satisfacer la demanda alimentaria (Jallow MF, 2017). El uso indiscriminado de pesticidas causa problemas ambientales como contaminación del suelo, agua, aire, pérdida de fertilidad, acidificación, lixiviación de nitrato en suelo e invasión de malezas, además de problemas en salud pública como incidencia de enfermedades renales, autoinmunes, esterilidad, cáncer, trastornos endocrinos y neurológicos (Jallow MF, 2017) (Guyton KZ, 2015). Es importante aclarar, que los pesticidas son el grupo de productos químicos que controlan organismos indeseables en la producción, se aplican para mejorar el rendimiento y calidad del cultivo (Okonya JS, 2019). Estos productos pueden ser inorgánicos y orgánicos como herbicidas, insecticidas, nematocidas, y fungicidas (Okonya JS, 2019).

Imagen 2. Impacto de los compuestos xenobióticos en el ecosistema del suelo (Okagu, 2023).

Impacto de los compuestos **Xenobióticos** en el ecosistema del suelo



El uso de pesticidas aumenta en países en vía de desarrollo, ya que son económicos y de fácil acceso, siendo India, Ecuador, Colombia, Ucrania, Turquía, Bolivia, Perú, Reino Unido, Alemania y Chile los países con mayor número de tierras agrícolas en el mundo. Colombia cuenta con una superficie de 1.109.500 km², de las cuales 425.030 km² están destinadas a uso agrícola, el país tuvo una tasa de consumo de pesticidas de 48,618.47 ton/año, de las cuales, 17.595.15 ton/año fueron herbicidas (Verma JP, 2014). Para el año 2013, la tasa de consumo en Colombia del herbicida glifosato fue de 9.605 ton, el cual es utilizado para inhibir la enzima 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintasa de las plantas, cuyo objetivo es impedir la síntesis de fenilalanina, triptófano y tirosina, al igual que del ácido benzoico, matando así la planta (Hove-Jensen B, 2014.)

Biorremediación por *Pseudomonas extremaustralis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*

La biorremediación microbiana por hongos, bacterias, actinomicetos y virus son una solución a la problemática de contaminación por pesticidas en los campos agrícolas, eliminando del suelo los organoclorados, organofosforados y carbamatos gracias a su actividad enzimática (Huang Y, 2018). Los microorganismos del suelo, que se encuentran en contacto con un compuesto xenobiótico, desarrollan un sistema genéticamente determinado para adaptarse a las condiciones de estrés, llevando a cabo

biotransformación, biomineralización, bioacumulación, o biodegradación del pesticida (Huang Y, 2018). La degradación de compuestos xenobióticos, es llevada a cabo por los microorganismos gracias al uso de enzimas catalizadoras que generan reacciones bioquímicas las cuales están involucradas en alguna vía para degradación del contaminante. Las enzimas con la capacidad degradadora se pueden agrupar en diferentes tipos, como se muestra en la Tabla 2. Diferentes cepas bacterianas se han caracterizado por tener la capacidad de tener el armamento enzimático para degradar compuestos xenobióticos, como lo son *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Ralstonia sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Nocardiopsis sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Acetobacter sp.* y *Alcaligenes sp.* (Verma JP, 2014)

Tabla 1. Enzimas que participan en la biorremediación y sus funciones (Sharma B, 2018).

Enzima	Ejemplo	Función
Oxidorreductasas	Oxigenasas	Catalizar la oxidación de compuestos aromáticos como por ejemplo los policlorobifenilos incorporando uno a dos moléculas de O llevando así a la transformación y mineralización del compuesto.
	Lacasas	En compuestos aromáticos realiza el corte del anillo, reduciendo así una molécula de O en agua y produce radicales libres.
	Peroxidasas	Cataliza la reacción de reducción en presencia de peróxidos, como el peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) y generar radicales libres reactivos después de la oxidación de compuestos orgánicos.
Hidrolasas	Lipasas	Tiene la capacidad de romper los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos. Es utilizada en tratamientos de aguas residuales, degradación de hidrocarburos poliaromáticos, etc.
	Celulasas	Descompone los compuestos celulolíticos en azúcares simples. Son usadas estas enzimas en tratamientos de residuos orgánicos, como los residuos de algodón aserrín y arroz.

	Carboxilesterasas	Cataliza la hidrólisis del enlace éster carboxílico presente en pesticidas sintéticos como los organofosforados con adición de agua.
	Fosfotriesterasas	Cataliza la hidrólisis del fosfodiéster, componente de los organofosforados.
	Deshalogenasas	Utilizado para la biodegradación de compuestos alifáticos halogenados como el 1,2,3-tricloropropano.

Se ha identificado que *P. extremaustralis* genera PHAs como mecanismo de almacenamiento de C cuando se encuentra expuesta a ciertas condiciones de deficiencia de P, N u O, y al tiempo un exceso de fuentes de C (López G, 2017). Se identifica el operón *phaABC*, conteniendo la PHA sintasa (*phaC*), la β -cetotiolasa (*phaA*) y la acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADP que permiten generar los biopolímeros (López G, 2017). Además de tener el gen *AlkB* que codifica una oxigenasa la cual le permite degradar el diesel tomándolo como fuente de Carbono.

Se observa que *B. subtilis* tienen un armamento enzimático con la capacidad de degradar xenobióticos, como es el caso de 4-cloro-2-nitrofenil (4C2NP), siendo un compuesto altamente tóxico y recalcitrante, que se utiliza para la fabricación de colorantes, pesticidas, medicamentos y productos químicos (PK, 2012). Este bacilo degrada 4C2NP gracias a la oxidación catalizada por una oxigenasa, liberando el ion nitrito (PK, 2012). También, se ha identificado que puede degradar los compuestos sin producir ningún producto tóxico, como fue en el caso de la degradación de la cipermetrina asociada a los genes codificantes de enzimas esterasa (700 pb) y lacasa (1200 pb) identificadas por PCR (Gangola S, 2018).

La bacteria *B. thuringiensis* también demostró tener la capacidad degradadora de compuestos complejos como quinalfos y fipronil, siendo estos un insecticida (Reddy, 2017) (Mandal K, 2013). El bacilo los tomó como única fuente C (Reddy, 2017) (Mandal K, 2013).

Conclusión

En conclusión, los microorganismos *Pseudomonas extremaustralis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis* representan una poderosa herramienta en la lucha contra la contaminación por xenobióticos y la restauración de ecosistemas dañados. Estos microorganismos han demostrado una extraordinaria capacidad para descomponer compuestos perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana y se caracterizan una gran versatilidad al abordar una amplia gama de contaminantes químicos, desde hidrocarburos hasta productos farmacéuticos y productos químicos industriales;

adaptabilidad a condiciones extremas, pues muchos de estos microorganismos son extremófilos; su capacidad para formar biopelículas y secretar enzimas los convierte en agentes eficaces en la biorremediación de suelos contaminados, cuerpos de agua y otros entornos contaminados y por último, la utilización de microorganismos degradadores reduce la necesidad de productos químicos tóxicos y métodos de limpieza costosos, lo que promueve prácticas más sostenibles en la gestión de la contaminación.

Referencias

- A, V. (2018). Glyphosate, the Most Widely Used Herbicide. Health and safety issues. Why scientists differ in their evaluation of its adverse health effects. *1*.
- Abdelhaleem HAR, Z. H. (2019). Identification and characterization of novel bacterial polyaromatic hydrocarbon-degrading enzymes as potential tools for cleaning up hydrocarbon pollutants from different environmental sources. *Environ Toxicol Pharmacol*, 67, pp. 108-116.
- Aislabie J, S. D. (2006). Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremófilos*, 10(3), pp. 171-179.
- Almeida AL, S. V. (2016). Bacillus thuringiensis : mecanismo de acción, resistencia y nuevas aplicaciones: una revisión. *Crit Rev Biotechnol*, 36, 317-326.
- Almeida AL, S. V. (2016). Bacillus thuringiensis: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36.
- Ambiental, P. d. (2000). Identificación del herbicida glifosato propiedades y toxicidad. *Documento plan de manejo Ambiental Erradicacion de Cultivos ilicitos*.
- Annett R, H. H. (2014). Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology*, 34(5).
- Arias E V, R. A. (2018). Contaminated land in Colombia: A critical review of current status and future approach for the management of contaminated sites. *Science of The Total Environment*, 618, pp. 199-209.
- Arrivillga, O. G. (2009). Bacillus thuringiensis: Avances y perspectivas en el control biológico de Aedes aegypti. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 49.

- Barman, M. &. (2024). Bacillus secondary metabolites and their applications in agriculture. In M. &. Barman, *BACTERIAL SECONDARY METABOLITES Synthesis and Applications in Agroecosystem* (pp. 239-253). Elsevier.
- Bateman A, C. P. (2010). DUFs: families in search of function. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, pp. 1148-1152.
- Catone MV, R. J. (2 de junio de 2014). High Polyhydroxybutyrate Production in *Pseudomonas extremaustralis* Is Associated with Differential Expression of Horizontally Acquired and Core Genome Polyhydroxyalkanoate Synthase Genes. *PLoS one*.
- Chen S, D. Y. (2015). Pathway and kinetics of cyhalothrin biodegradation by *Bacillus thuringiensis* strain ZS-19. *Scientific Reports*, 5.
- Chen Yongsheng, C. W.-J. (2022). Insights into the microbial degradation and resistance mechanisms of glyphosate. *Environmental research*, p. 114153.
- Colonnella MA, L. L. (2019). Effect of copper on diesel degradation in *Pseudomonas extremaustralis*. *Extremophiles*.
- Desler C, S. P. (2009, Septiembre 16). In Silico screening for functional candidates amongst hypothetical proteins. *BMC Bioinformatics*, p. 289.
- Doolotkeldieva T, K. M. (2018). Microbial communities in pesticide-contaminated soils in Kyrgyzstan and bioremediation possibilities. *Environmental Science and Pollution Research*, 25.
- Earl AM, L. R. (2010). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in microbiology*.
- Errington J., W. L. (2017). Cell Cycle Machinery en *Bacillus subtilis*. *Subcellular Biochemistry*, 84, pp. 45-65.
- EV, G. M. (2004). 'Conserved hypothetical' proteins: prioritization of targets for experimental study. *Nucleic acids research*, 32, pp. 5452-5463.
- F, M. (2018). Estrategias de biorremediación de glifosato en suelos bajo explotación agrícola intensiva. *Universidad de Buenos Aires*.
- Finn RD 1, B. A. (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Research*, 42.
- FT, T. S. (2010). Archaeal-like chaperonins in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47.
- Gangola S, S. A. (2018). Presence of esterase and laccase in *Bacillus subtilis* facilitates biodegradation and detoxification of cypermethrin. *Scientific reports*, 8.

- Garcia Birolli Willian, F. d. (2022). Biodegradación del piretroide cipermetrina por consorcios bacterianos recolectados de cultivos de naranja. *Environmental Research*, p. 114388.
- GenBank. (n.d.). Genome Bacillus subtilis. *National Center for Biotechnology Information*.
- Gomes MP, S. E.-E. (2014). Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of Experimental Botany*, 65(17), pp. 4691-4703.
- Gomez LE, H. A. (2017). La problemática de los plaguicidas en Colombia. *Caso Roundop- Arma binaria de guerra*, 1.
- Gough J, K. K. (2001). Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *Journal of Molecular Biology*, 313.
- Gouthami, K. e. (2023). Microbial Biodegradation and Biotransformation of Petroleum Hydrocarbons: Progress, Prospects, and Challenges. In M. B. Vineet Kumar, *Genomics Approach to Bioremediation* (pp. 229-247).
- Guyton KZ, L. D. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol*, 16(5).
- Hanson AD, P. A.-L. (2009). 'Unknown' proteins and 'orphan' enzymes: the missing half of the engineering parts list--and how to find it. *Biochem J*, p. 425.
- Hove-Jensen B, Z. D. (2014.). Utilization of Glyphosate as Phosphate Source: Biochemistry and Genetics of Bacterial Carbon-Phosphorus Lyase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74, pp. 176-197.
- Huang Y, X. L. (2018). Microbial Degradation of Pesticide Residues and an Emphasis on the Degradation of Cypermethrin and 3-phenoxy Benzoic Acid: A Review. *Molecules*.
- Ijaq J, M. G. (2019). A model to predict the function of hypothetical proteins through a nine-point classification scoring schema. *BMC Bioinformatics*, 14.
- Information, N. C. (2019). Glyphosate. *PubChem Database*.
- Islam S, S. S. (2015). In Silico Structural and Functional Annotation of Hypothetical Proteins of Vibrio cholerae O139. *Genomics & informatics*, pp. 53-59.
- Iyengar BR, W. A. (2022). GroEL/S Overexpression Helps to Purge Deleterious Mutations and Reduce Genetic Diversity during Adaptive Protein Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, pp. 2-39.

- Jallow MF, A. D. (2017). Pesticide Knowledge and Safety Practices among Farm Workers in Kuwait: Results of a Survey. *Int J Environ Res Public Health*, 14.
- Javaid MK, A. M. (2016). Potential of Biological Agents in Decontamination of Agricultural Soil. *Scientifica (Cairo)*.
- JM, J. (2017). Revisiting protein structure, function, and evolution in the genomic era. *Journal of Invertebrate Pathology*, 142, pp. 11-15.
- Joo, M. &. (2013). Characteristics of crude oil biodegradation by biosurfactant-producing bacterium *Bacillus subtilis* JK-1. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 56, pp. 193-200.
- JP, C. (2010). Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilización de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. *PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA*.
- Kirichuk, Z.-G. C. (2023). Bioremediation of polluted soils with pesticides using microorganisms - situation in Colombia. *RUDN Journal of Ecology and Life Safety*.
- Ławniczak Ł, W.-K. M. (2020). Microbial Degradation of Hydrocarbons-Basic Principles for Bioremediation: A Review. *Molecules*, p. 856.
- López G, D. C. (2017). Draft genome sequence of *Pseudomonas extremaustralis* strain USBA-GBX 515 isolated from Superparamo soil samples in Colombian Andes. *Stand Genomic Sci*.
- López NI, P. M. (2009). *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a Poly(3-hydroxybutyrate) producer isolated from an antarctic environment. *Current Microbiology*, 59, pp. 514-519.
- Lubec G, A.-S. L. (2005). Searching for hypothetical proteins: Theory and practice based upon original data and literature. *Progress in Neurobiology*, 77, pp. 90-127.
- Lv P, W. J. (2023). Unraveling the Diverse Roles of Neglected Genes Containing Domains of Unknown Function (DUFs): Progress and Perspective. *Int J Mol Sci*, p. 4187.
- Macario EC, R. F. (2017). Prokaryotic Chaperonins as Experimental Models for Elucidating Structure-Function Abnormalities of Human Pathogenic Mutant Counterparts. *Frontiers in molecular biosciences*, 3.
- Macario EC, Y. M. (2019). Bridging human chaperonopathies and microbial chaperonins. *Communications biology*, 2.

- Mandal K, S. B. (2013). Microbial degradation of fipronil by *Bacillus thuringiensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety, Volume 93*, pp. 87-92.
- Mertens M, H. S. (2018). Glyphosate, a chelating agent—relevant for ecological risk assessment? *Environmental science and pollution research international, 25*, pp. 5298–5317.
- Montagnolli RN, L. P. (n.d.). Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. *Environ Monit Assess*.
- Morris R, B. K. (2022). Uncovering protein function: from classification to complexes. *Essays Biochem*, pp. 255-285.
- Mulder, G. K. (2012). Function Prediction and Analysis of Mycobacterium tuberculosis Hypothetical Proteins. *Int J Mol Sci.*, pp. 7283-7302.
- NI, T. P. (2018). Reporting Key Features in Cold-Adapted Bacteria. *Life (Basel)*.
- Okagu, I. O. (2023). Overhauling the ecotoxicological impact of synthetic pesticides using plants' natural products: a focus on *Zanthoxylum* metabolites. *Environ Sci Pollut Res 30*, pp. 67997–68021.
- Okonya JS, P. A. (2019). Pesticide Use Practices in Root, Tuber, and Banana Crops by Smallholder Farmers in Rwanda and Burundi. *Int J Environ Res Public Health, 16*.
- Oliveira WL, A. C. (2018). Functional annotation of hypothetical proteins from the *Exiguobacterium antarcticum* strain B7 reveals proteins involved in adaptation to extreme environments, including high arsenic resistance. *PLoS One, 13*.
- Panorama de biorremediación en Colombia . (n.d.). *Invermar*.
- PK, A. (2012). Decoloración del 4-cloro-2-nitrofenol por una bacteria del suelo, *Bacillus subtilis* RKJ 700. *PLOS ONE*.
- Portela DD, C. A. (23 de mayo de 2013). La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *NOVA*.
- Qing Wang, S. G. (2022). Thermally enhanced bioremediation: A review of the fundamentals and applications in soil and groundwater remediation. *Journal of Hazardous Materials*, p. 128749.
- Raiger Iustman LJ, T. P. (2015). Genome sequence analysis of *Pseudomonas extremaustralis* provides new insights into environmental adaptability and extreme conditions resistance. *Extremófilos, 19(1)*, pp. 207-220.

- Ramasamy Kesava P, B. S. (2023). Pseudomonas ability to utilize different carbon substrates and adaptation influenced by protozoan grazing. *Environmental Research*, p. 116419.
- Rayu S, N. U. (2017). Isolation and Molecular Characterization of Novel Chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol-degrading Bacteria from Sugarcane Farm Soils. *Front Microbiol.*
- Reddy, P. K. (2017). Influence of environmental factors on biodegradation of quinalphos by *Bacillus thuringiensis*. *Environmental sciences Europe*.
- Rosso-Pinto Mauricio, V.-F. V.-N. (2023). Organochlorine and organophosphate pesticides in soils of a vulnerable area from an aquifer in Northern Colombia. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, pp. 1807-1929.
- Safdari, M. K. (2017). Study Potential of Indigenous *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in Bioremediation of Diesel-Contaminated Water. *Water, Air, & Soil Pollution*.
- Sakthipriya N, D. M. (2015). Bioremediation of Coastal and Marine Pollution due to Crude Oil Using a Microorganism *Bacillus subtilis*. *Procedia Engineering*, 116, pp. 213-220.
- Satapute P, P. M. (2019, Agosto). Physiological adaptation and spectral annotation of Arsenic and Cadmium heavy metal-resistant and susceptible strain *Pseudomonas taiwanensis*. *Environmental Pollution*, 251, pp. 555-563.
- Seydlová G, H. P. (2012). DnaK and GroEL chaperones are recruited to the *Bacillus subtilis* membrane after short-term ethanol stress. *Journal of Applied Microbiology*, 112.
- Shahbaaz M, I. M. (2013). Functional Annotation of Conserved Hypothetical Proteins from *Haemophilus influenzae* Rd KW20. *PLoS one*, 8.
- Sharma B, D. A. (2018). Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. *J Environ Manage*, 210, pp. 10-22.
- Shi L, R. V. (2016). Tyrosine 601 of *Bacillus subtilis* DnaK Undergoes Phosphorylation and Is Crucial for Chaperone Activity and Heat Shock Survival. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Singh A., C. S. (2016). Microbial-Mediated Management of Organic Xenobiotic Pollutants in Agricultural Lands. *Plant Responses to Xenobiotics*, pp. 211-230.
- Spiers AJ, D. H. (2023). Bioinformatics characterization of BcsA-like orphan proteins suggest they form a novel family of pseudomonad cyclic- β -glucan synthases. *PLoS One*, pp. 2-18.

- Stülke J, G. A. (2023). *Bacillus subtilis*, a Swiss Army Knife in Science and Biotechnology. *Journal of Bacteriology*, p. 205.
- Sun Y, C. W. (2021). Nutrient depletion is the main limiting factor in the crude oil bioaugmentation process. *J Environ Sci (China)*, pp. 317-327.
- Sviridov AV, S. T. (2014). Glyphosate: Safety Risks, Biodegradation, and Bioremediation. In M. Maalmi, *Current Environmental Issues* (p. 183).
- Tabari, K. &. (2017). Characterization of a biodegrading bacterium, *Bacillus subtilis*, isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14, pp. 2583-2590.
- Tribelli PM, S. E. (2015). Novel Essential Role of Ethanol Oxidation Genes at Low Temperature Revealed by Transcriptome Analysis in the Antarctic Bacterium *Pseudomonas extremaustralis*. *PLoS One*.
- Vásquez F, H. S. (2018). Phylogenetic MLSA and phenotypic analysis identification of three probable novel *Pseudomonas* species isolated on King George Island, South Shetland, Antarctica. *Braz J Microbiol*.
- Vera MS, L. S. (2010). New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19(4), pp. 710–721.
- Verma JP, J. D. (2014). Pesticide relevance and their microbial degradation: a-state-of-art. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 13, pp. 429-466.
- W, H. (2001). Chaperone-Assisted Protein Folding in the Cell Cytoplasm. *Current Protein & Peptide Science*, 2(3).
- Weiss C, J. F. (2016). Dynamic Complexes in the Chaperonin-Mediated Protein Folding Cycle. *Frontiers in molecular biosciences.*, 3.
- Xiao Y, C. S. (2015). Isolation of a novel beta-cypermethrin degrading strain *Bacillus subtilis* BSF01 and its biodegradation pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99.

Potencial de los péptidos antimicrobianos como agentes antimicrobianos y antifúngicos

Martha Gómez Jiménez³¹
Ruth Mérida Sánchez Mora³²
Gabriela Arévalo Pinzón³³

Resumen

El aumento de la resistencia a los antimicrobianos ha motivado la exploración de nuevas opciones terapéuticas. Entre las estrategias en estudio se incluye la investigación de péptidos antimicrobianos (PAMs), que son pequeñas moléculas proteicas. A pesar de su importancia, algunos de estos péptidos no solo afectan a los microorganismos, sino que también muestran actividad en las células humanas. Por lo tanto, se han implementado diversas estrategias para mejorar la selectividad de estas secuencias. El objetivo del capítulo de libro del diario de campo busca mostrar la importancia de los PAMs como agentes antimicrobianos y antifúngicos. Se realizó una revisión de la literatura con el fin de abordar la importancia de la resistencia microbiana, la estructura tanto de la pared de los microorganismos que son importantes en el uso de estas moléculas como potencial terapéutico frente a la resistencia a los microorganismos. La presente revisión narrativa muestra la importancia de la resistencia microbiana, la estructura de la pared de los microorganismos y la estructura de los PAMs para mostrar cómo pueden ser utilizados como antimicrobianos. Finalmente, se presenta el potencial de los PAMs como pequeñas moléculas antimicrobianas y antifúngicas, alternativas terapéuticas prometedoras a

³¹Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Docente investigadora Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. marthagomez@unicolmayor.edu.co

³² PhD Universidad Nacional de Colombia. Docente investigadora Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Correo electrónico: rmsanchezm@uicolmayor.edu.co

³³ Docente investigadora Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Correo electrónico: garevalop@unicolmayor.edu.co

los antibióticos de amplio espectro y modo de acción único contra microorganismos patógenos.

Palabras clave: Péptidos antimicrobianos. Resistencia antimicrobiana, antibióticos.

Introducción

La utilización extendida de antimicrobianos en las últimas décadas ha promovido el surgimiento de microorganismos resistentes a diversos fármacos. La resistencia a múltiples antibióticos se ha catalogado como uno de los treinta y un riesgos asociados a la problemática de Salud Pública.

En la actualidad, la actividad de una nueva clase de antimicrobianos, conocidos como péptidos antimicrobianos (PAMs), incluyendo los sintéticos cortos, está generando un creciente interés como una estrategia importante para combatir la resistencia. Se ha argumentado que, en particular, los PAMs catiónicos exploran aspectos fundamentales de la célula bacteriana, lo que reduce la probabilidad de que surja resistencia en comparación con lo observado en el caso de los antibióticos convencionales.

Frente a la resistencia antimicrobiana (RAM), se han propuesto diversas estrategias de contención que involucran principalmente el desarrollo de políticas para controlar la distribución y uso de antibióticos y la prioridad en la investigación y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. Dentro de éstos nuevos agentes, cabe resaltar el desarrollo de unas moléculas denominadas PAMs, moléculas que han mostrado acciones rápidas sobre microorganismos, distintos blancos y mecanismos de acción diferentes a los mecanismos clásicos de los antimicrobianos convencionales (Boparai & Sharma, 2020).

Varios estudios han propuesto estrategias adicionales para mejorar la selectividad de los PAMs, y la reducción del tamaño del péptido se presenta como una alternativa sencilla, rentable y efectiva (Chen et al., 2023). En términos generales, se espera que los nuevos péptidos demuestren una mayor actividad bactericida que el péptido original. Además, los datos de citotoxicidad deben confirmar que el péptido no causa hemólisis a una concentración Mínima Inhibitoria (CMI) evaluada. Estas investigaciones buscan identificar secuencias con una selectividad superior hacia microorganismos de relevancia clínica, en respuesta a la urgente necesidad de desarrollar nuevos agentes antimicrobianos (Chen et al., 2023).

En este contexto, actualmente se está trabajando en la identificación y diseño de nuevos PAMs a partir de extensas bibliotecas de péptidos sintéticos (Chen et al. en 2023). En estos estudios, el grupo de Camargo, en 2013, descubrió que secuencias de PAMs con aproximadamente 17 residuos de longitud demuestran actividad contra cepas de bacterias *E. coli* ATCC 35218 y *E. coli* ML-35, con concentraciones mínimas inhibitorias de 22 μ M y 44 μ M, respectivamente. Sin

embargo, es importante señalar que a estas mismas concentraciones que inhiben las bacterias, se observa una hemólisis superior al 1% (Camargo & Serrano, 2013).

Importancia de la Resistencia Antimicrobiana

La RAM es uno de los principales retos que se afrontan actualmente para tratar enfermedades infecciosas en el mundo (Morrison & Zembower 2020). La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que las enfermedades infecciosas han sido y continúan siendo una de las principales causas de mortalidad en el mundo, convirtiéndose en un desafío epidemiológico de Salud Pública (OMS,2017).

En el ámbito clínico, los compuestos conocidos como antimicrobianos son las moléculas de elección para combatir las infecciones. Estos antimicrobianos surgieron en el año 1900 y experimentaron un crecimiento significativo hasta el año 2000. Sin embargo, a partir de ese año, se ha observado un marcado descenso en la aprobación de nuevos antimicrobianos por parte de la FDA. Una de las causas de esta reducción en la introducción de nuevos agentes antimicrobianos es la rápida aparición de RAM (Karp et al., 2017; Morrison & Zembower 2020). Estos compuestos se denominan antibióticos, antimicóticos, antivirales y antiparasitarios según el tipo de microorganismo que combaten (Vanzolini, et al..2022)

En el ámbito clínico, los antibióticos son la principal herramienta terapéutica para combatir microorganismos infecciosos (Pérez, 2019). Desde su introducción, estos agentes han logrado hazañas significativas en términos de eficacia. Sin embargo, el uso irracional de los mismos ha desencadenado la emergencia y propagación de microorganismos resistentes. Aunque la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno evolutivo natural que puede ser acelerado por factores epidemiológicos y biológicos, el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos ha intensificado su desarrollo (Gómez, 2020). Como resultado, se ha generado un problema de dimensiones profundas que ha sido reconocido como una de las mayores amenazas para la salud humana y para los sistemas de salud en el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Ioannou et al., 2023).

Que son los antimicrobianos

Los antimicrobianos forman parte de los fármacos más comúnmente prescritos en el mundo. Son sustancias químicas de origen natural, semisintética o sintética que en concentraciones in vivo, eliminan o inhiben el crecimiento de diferentes microorganismos como bacterias, virus, hongos y parásitos, al interactuar con un blanco específico (Aguirre Guataqui et al., 2023; Oliveros et al., 2023).

Los antimicrobianos se pueden clasificar como de amplio espectro, cuando su actividad se extiende a un gran número de especies, como los carbapenémicos, amoxicilina, piperacilina-tazobactam, entre otros (Fernández-Cuenca et al., 2019); o de espectro reducido, cuando solo presentan actividad sobre un pequeño grupo de especies como las cefalosporinas de primera generación, cuya actividad se refleja especialmente sobre los *Staphylococcus* resistentes a penicilina y sensibles a meticilina. Dependiendo del agente sobre el que actúan reciben distintas connotaciones, particularmente sobre bacterias reciben el nombre de antibióticos. De acuerdo con su actividad pueden ser bactericidas o bacteriostáticos; los bactericidas causan la muerte bacteriana, mientras que los bacteriostáticos impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana, procesos que el microorganismo recupera al retirar el antimicrobiano.

Resistencia antimicrobiana (RAM)

A pesar de los numerosos avances científicos que han revolucionado nuestra comprensión del mundo antimicrobiano, se han identificado nuevas problemáticas, como la aparición de patógenos altamente resistentes a los antimicrobianos (Tang et al., 2023). La supervivencia de los microorganismos involucra una serie de mecanismos que se propagan en las poblaciones, lo que se ha convertido en uno de los desafíos más importantes de la salud pública en la última década (Chávez-Jacobo, 2020).

La Resistencia Antimicrobiana (RAM) se puede definir como la capacidad que tiene un microorganismo para reproducirse o mantenerse con vida cuando se encuentra expuesto a un agente antimicrobiano (Mitchell et al., 2020). La RAM ha surgido debido a la aparición de una variedad de mecanismos de cambio en los microorganismos, donde las formas en que se adquiere esta resistencia incluyen mutaciones en el material genético bacteriano o la transferencia de genes de resistencia (Quiñones et al., 2017). Se distinguen dos tipos de resistencia, a saber, la resistencia natural y la resistencia que se adquiere posteriormente (Barbosa-Rengifo et al., 2016).

La resistencia natural a los antimicrobianos se describe como una característica resultante de la selección natural, impulsada por mecanismos aleatorios específicos de cada familia de microorganismos. Estos mecanismos permiten que los microorganismos que poseen esta característica prosperen al evitar que el antimicrobiano ejerza su efecto (Rojas & Ulate, 2017). Además, se encuentra presente una resistencia innata o intrínseca en bacterias como el *Mycoplasma*, las cuales no cuentan con una pared celular y, por lo tanto, carecen de un sitio de unión para los antibióticos betalactámicos (Angles, 2018). En el caso de la resistencia natural, todas las bacterias de una especie específica presentan resistencia a ciertas categorías de antibióticos. Esto les proporciona una ventaja competitiva en comparación con otras cepas, ya que les permite sobrevivir si se utiliza ese tipo de antibiótico (Mora & Fabián, 2019).

En cuanto a la resistencia adquirida, esta surge debido a modificaciones específicas en el ADN. Actualmente, este tipo de resistencia representa un desafío importante y se identifica mediante pruebas de sensibilidad. Se manifiesta en los casos de tratamiento ineficaz, los cuales se atribuyen a cambios en el material genético cromosómico y a mecanismos de transferencia de material genético adicional, como plásmidos, transposones o integrones. Como consecuencia, el microorganismo deja de responder a un antimicrobiano al que previamente era susceptible.

Microorganismos de importancia clínica y RAM

A nivel mundial las organizaciones médicas como la OMS, han expresado grandes preocupaciones sobre el estado actual de la salud humana debido al incremento y aparición de nuevas resistencias antimicrobianas (McEwen & Collignon, 2018). En enero de 2013, el informe emitido por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades señaló que, en el Reino Unido y los Estados Unidos, más del 90% de las variedades de *S. aureus* eran resistentes a la penicilina. Además, en algunas comunidades, más del 50% de las cepas mostraban resistencia a la metilicina. (MRSA).

La OMS y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) han evidenciado que la RAM ha repercutido negativamente en la eficacia de los tratamientos de diferentes patologías infecciosas y en la contención de bacterias multi-resistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR), lo cual tiene un impacto directo sobre la mortalidad, estancia hospitalaria, propagación de la infección y costos asociados. A partir de este problema se ha mencionado la necesidad urgente de aplicar estrategias para combatir microorganismos de importancia clínica. Se estima que para el año 2050 se generarán más muertes a causa microorganismos resistentes que por diabetes, cáncer u otras patologías. En consecuencia y con el fin incentivar el desarrollo de alternativas para mitigar la RAM, la OMS publicó una lista en la que se enumeran los patógenos prioritarios en investigación y desarrollo de nuevos agentes (Ayala, 2023).

En se muestra tabla 1 los microorganismos clasificados según sus niveles de resistencia antimicrobiana en prioridad crítica, elevada o intermedia (tabla 1) (OMS., 2017).

Tabla 1. Principales microorganismos clasificados como patógenos prioritarios por la OMS (OMS, 2022).

IMPORTANCIA CLINICA	MICROORGANISMOS	RESISTENCIA
Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenémicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenémicos
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Carbapenémicos, productoras de ESBL
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	XDR
Elevada	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
	<i>Campylobacter spp</i>	Fluoroquinolonas
	<i>Salmonella sp</i>	Fluoroquinolonas
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporina Fluoroquinolonas
Media	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
	<i>Shigella spp.</i>	Fluoroquinolonas

En Colombia, según el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA), se informa sobre la aparición de nuevos brotes con mecanismos de resistencia, tales como "el gen *cfr* en *Staphylococcus epidermidis*, el gen *poxtA* en *Enterococcus faecium* y la coproducción de *poxtA* y *optrA* en *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*". (Instituto Nacional de Salud ,2023). Durante el período comprendido entre 2012 y 2014, se observó un aumento en la resistencia bacteriana en unidades de cuidados intensivos. Esta resistencia alcanzó el 26.3% en el caso de *E. coli* frente a cefalosporinas de tercera generación, el 14.6% en *Klebsiella pneumoniae* frente a ertapenem, el 38.8% en *Pseudomonas aeruginosa*, y superó el 50% en *Acinetobacter baumannii* frente a carbapenémicos. (Porrás & Salgado, 2017). Estos hallazgos fueron respaldados por un estudio descriptivo realizado por la Red de Vigilancia de Eventos Nosocomiales del Valle (RENOVA), que incluyó muestras tomadas en clínicas y hospitales de Cali. En este estudio, se observó una alta prevalencia de resistencia a los antimicrobianos en aislados de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *S. aureus*.

También se ha observado un aumento en la tasa de mortalidad debido a infecciones fúngicas causadas por *Candida* y *Aspergillus*. Las candidiasis representan el 90% de las micosis invasivas a nivel global y pueden manifestarse con una amplia gama de síntomas, desde leves hasta sepsis fulminantes. La prevalencia de *C. albicans*, *Candida auris*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* varía según la región geográfica. Las infecciones por levaduras del género *Candida* sp afectan principalmente a pacientes hospitalizados que se encuentran inmunocomprometidos como pacientes en quimioterapia, con neoplasias hematológicas o en cuidados intensivos. Es así como el desarrollo de resistencia en *Candida* representa un reto importante a nivel terapéutico (Guirao, 2016). Los tratamientos más utilizados contra estas levaduras son las equinocandinas y los azoles. Sin embargo, la aparición de cepas resistentes a los diferentes antifúngicos ha dificultado mucho un tratamiento oportuno, aún más, cuando se observa el reducido número antifúngicos disponibles (Rodríguez, 2019).

Así, los microorganismos que han generado mayor alerta debido a su resistencia frente a los antimicrobianos son en su mayoría bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos principalmente por *Candida* (Oliveros et al.,2023; Cubas & Huaripata, 2019).

La pared y la membrana de los microorganismos desempeñan un papel crucial en su supervivencia y respuesta a los agentes antimicrobianos. Estas estructuras no solo proporcionan la integridad y la forma a las células, sino que también desempeñan un papel fundamental en la regulación del flujo de sustancias y en las interacciones con el entorno circundante. La comprensión de la composición y la función de la pared y la membrana de los microorganismos es esencial para abordar el desafío creciente de la resistencia antimicrobiana, ya que muchas estrategias terapéuticas se dirigen a estas estructuras.

Composición de la pared y membrana de bacterias Gram-negativas

Las bacterias Gram positivas están estructuralmente compuestas por una pared celular que consta de polímeros (peptidoglicano o mureína) con un grosor que oscila entre 0.02 y 0.06 μm . Esta estructura se forma a partir de dos aminoazúcares: la N-acetilglucosamina y el N-acetilmurámico, los cuales están unidos por enlaces β -1,4 y se disponen en forma de capas múltiples (Figura 1).

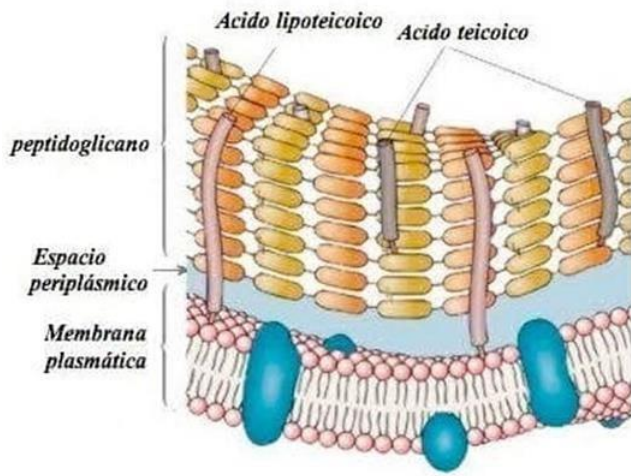


Figura 3. Arquitectura de la pared bacteriana de Gram positivas con peptidoglicano de 0.02 a 0.06 μm , ácidos lipoteicoicos y su membrana externa, (Cowan, 2018).

Además, la pared bacteriana también está compuesta por ácidos teicoicos, ácidos teucorónicos, ácidos lipoteicoicos, lipoglicanos y modificaciones polisacáridas. Los ácidos teicoicos y lipoteicoicos son polímeros aniónicos con diversas estructuras químicas presentes en todas las bacterias Gram-positivas (excepto *Streptococcus pneumoniae*), lo que confiere una carga negativa a la pared celular. Los ácidos teicoicos pueden unirse al ácido N-acetilmurámico o a los lípidos de la membrana plasmática (ácidos lipoteicoicos), estableciendo así una conexión entre el peptidoglicano y la membrana citoplasmática. En términos generales, estos ácidos son componentes de los factores de virulencia de estos microorganismos, ya que funcionan como antígenos de superficie que se adhieren a receptores específicos en las células del huésped (Berdize et al., 2015).

Composición de la pared y membrana de bacterias Gram-negativas

Las bacterias Gram negativas poseen una estructura celular trilaminar que comprende la membrana plasmática, el espacio periplásmico (que incluye una delgada capa de peptidoglicano con un grosor de 0.01 μm) y una membrana externa que contiene fosfolípidos y proteínas que se enlazan al peptidoglicano (figura 2). Esta membrana externa se compone de una bicapa lipídica anfipática que alberga el lipopolisacárido (LPS), una endotoxina compuesta por tres componentes: el lípido A, el polisacárido central o Core y la cadena lateral O. La variabilidad

en la cadena lateral O se utiliza para llevar a cabo la clasificación serológica de las bacterias (Vargas-Flores & Kuno-Vargas, 2015).

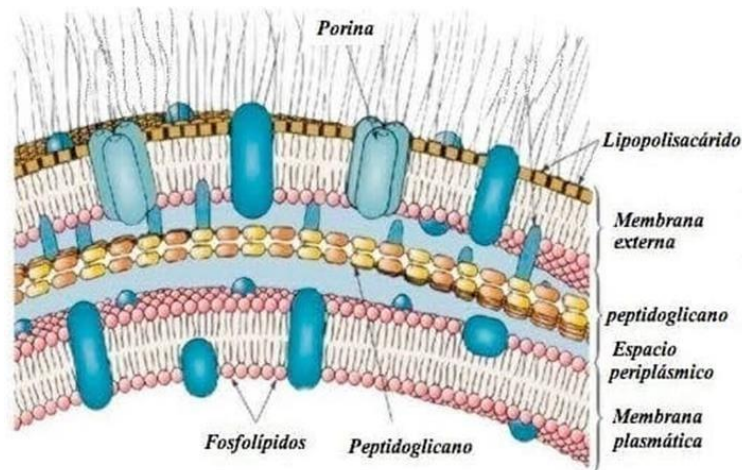


Figura 2. Arquitectura de la pared bacteriana de Gram negativas, las bacterias Gramnegativas contienen una fina capa de peptidoglicano de $0.01 \mu\text{m}$ íntimamente unido las membranas internas, externa y las porinas (Cowan, 2018).

Una de las funciones clave desempeñadas por la membrana externa radica en su papel como defensora, actuando para prevenir o reducir la entrada de compuestos dañinos como sales biliares, antibióticos y otras sustancias tóxicas que podrían causar daño o destruir a la bacteria. Además, esta membrana cumple la función de evitar la pérdida de componentes esenciales, incluyendo las enzimas presentes en el espacio periplásmico. Es importante destacar que la membrana externa presenta una permeabilidad mayor en comparación con la membrana plasmática, lo que le permite permitir el paso de moléculas pequeñas como glucosa y otros monosacáridos. En esta membrana también hay porinas, canales que permiten el paso de moléculas al interior de la célula bacteriana.

2.3 Estructura de la pared celular de *Candida albicans*

La *C. albicans* es un hongo dimórfico oportunista altamente infeccioso y con la habilidad de infectar tejido queratinizado y de producir infecciones superficiales o sistémicas. Sus factores de virulencia le confieren la capacidad de adherencia al hospedero, y la secreción de enzimas degradativas le permite la formación de biopelículas. A diferencia de las bacterias, la estructura fúngica de la *C. albicans* está dada por una célula eucariota, cuya

envoltura está conformada por quitina, glucano y manano o galactomanano. El β -1,6 D-glucano juega un papel esencial en la organización estructural de la pared celular interconectando el β -1,3 D-glucano y la quitina. Por su parte, las proteínas generalmente se asocian a polisacáridos formando glicoproteínas dando origen a una estructura rígida (Figura 3).

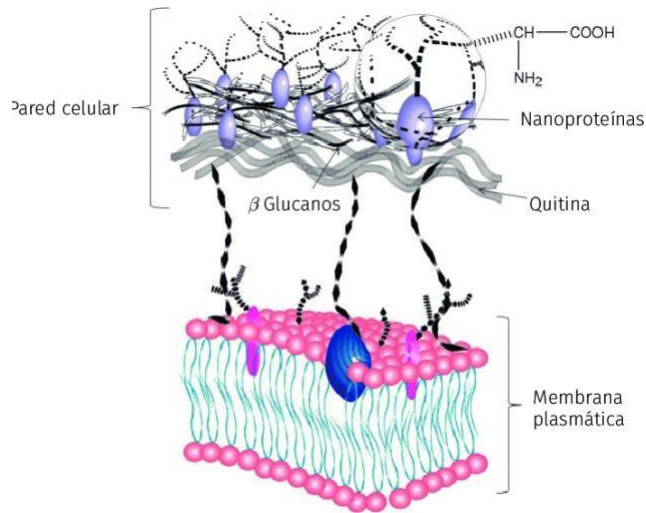


Figura 3. Arquitectura de la pared celular de *C. albicans*.

https://www.researchgate.net/figure/FIGURA-3-Modelo-de-la-estructura-de-la-pared-celular-de-las-levaduras_fig1_322436954

La composición y función de la pared y la membrana de los microorganismos desempeñan un papel central en su capacidad de resistir los agentes antimicrobianos. Comprender en profundidad estas estructuras es fundamental para abordar eficazmente la creciente amenaza de la resistencia antimicrobiana. La investigación continua en este campo es esencial para desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas, que puedan combatir las infecciones de manera más precisa y minimizar el desarrollo de resistencia. Además, la preservación de la eficacia de los agentes antimicrobianos existentes y el desarrollo de nuevos enfoques son tareas cruciales para garantizar la salud pública y el éxito de la medicina moderna en el control de las enfermedades infecciosas. El conocimiento y la innovación en este ámbito seguirán siendo esenciales para afrontar los desafíos cambiantes que plantea la resistencia antimicrobiana en el futuro.

Estrategias para Controlar la Proliferación de Microorganismos Resistentes

En respuesta a la grave problemática mundial de la RAM, se han explorado diversas estrategias para combatir microorganismos resistentes y para mitigar el desarrollo y diseminación de esa resistencia. Esta problemática ha sido abordada desde dos frentes: por un lado, el desarrollo de estrategias de prevención y buenas prácticas hospitalarias; y, por otro lado, la investigación y desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas (Ayala, 2023; Quiñones, 2017).

Control del uso de los antimicrobianos

Actualmente, diversas organizaciones, como la OMS, han implementado directrices para la vigilancia y el control del uso de antimicrobianos mediante sistemas como la Clasificación ATC (Clasificación Anatómica Terapéutica Química) y la unidad técnica de medida para el control de las dosis de antimicrobianos, conocida como Dosis Diaria Definida (DDD). Con el propósito de uniformizar los enfoques de medición, seguimiento y notificación del consumo de antimicrobianos en todo el mundo, se han implementado estas iniciativas. De manera similar, en Colombia, el Gobierno Nacional ha desarrollado políticas de prevención, supervisión epidemiológica y control de infecciones intrahospitalarias, a cargo de la Secretaría de Salud de Bogotá y del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA). Estas políticas se centran en promover el uso responsable de antibióticos, supervisar la resistencia antimicrobiana y restringir la venta de antibióticos sin prescripción médica odontológica.

Identificación de conductas y campañas educativas

Las autoridades gubernamentales han hecho hincapié en la importancia de identificar comportamientos relacionados con la propagación y difusión de la RAM con el objetivo de desarrollar estrategias para modificar dichos comportamientos (Gómez, 2020). Entre las conductas más comunes se encuentran prácticas como la administración de antibióticos sin prescripción médica, el uso de antibióticos para tratar infecciones virales, la reducción de la calidad de los medicamentos para abaratar costos, las prescripciones incorrectas, la tendencia

de algunos pacientes a compartir sus tratamientos y las deficiencias en la prevención y el control de las infecciones. (Cati & Rosendo, 2019).

Con el propósito de combatir estas prácticas, organismos como OMS, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Asociación Colombiana de Infectología (ACIN), en colaboración con otras organizaciones, establecen alianzas para llevar a cabo iniciativas de educación dirigidas al público en general. Estas iniciativas se centran en promover el uso apropiado de los antibióticos, fomentar el control en la gestión de estos antimicrobianos y concienciar y capacitar tanto a profesionales de la salud como a personal en clínicas y hospitales (Correa, 2019).

Modificación de sistemas de cría y producción animal

La contaminación ambiental resultante del uso inapropiado de antibióticos en diversas áreas, como la ganadería, la acuicultura, la avicultura, la agricultura, la cadena alimentaria y el consumo humano, plantea una seria amenaza para el ecosistema en su conjunto. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), uno de los mayores riesgos para la salud de los consumidores asociados al uso de antibióticos en animales radica en el desarrollo de resistencia bacteriana en esos mismos animales (Gómez, 2020). Con el objetivo de reducir el empleo de antibióticos en este sector, se están implementando estrategias de información, educación y capacitación.

Nuevas alternativas terapéuticas

A nivel global, hay una creciente inquietud acerca de la rápida propagación de la resistencia antimicrobiana (RAM) y la insuficiente generación de nuevos agentes terapéuticos (Gómez, 2020). En respuesta a este desafío, diversas instituciones, como el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), están colaborando con investigadores académicos para buscar alternativas en el tratamiento y la prevención de infecciones. Sin embargo, es necesario impulsar aún más la innovación y la investigación con el fin de identificar, desarrollar y evaluar nuevas terapias destinadas a combatir las infecciones (Aldama, 2019). En la actualidad, los organismos gubernamentales reconocen la imperante necesidad de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para abordar las infecciones microbianas. Como respuesta a esta urgencia, se han implementado políticas orientadas hacia la creación de metodologías innovadoras para el control de las infecciones y el respaldo a la investigación y desarrollo de nuevas moléculas (Ioannou et al., 2023). Esto se debe a la notable disminución en la producción

de nuevos antibióticos en las dos últimas décadas y a la escasez de opciones terapéuticas disponibles (Li et al.,2023).

Por lo tanto, los progresos en biotecnología farmacéutica han generado la necesidad de una regulación más rigurosa en cuanto a los aspectos técnicos relacionados con la evaluación de la calidad, seguridad y eficacia de los nuevos medicamentos.

Actualmente diversos tipos de moléculas se encuentran en investigación y desarrollo para combatir microorganismos resistentes. Entre las estrategias más representativas se encuentra la investigación de metabolitos de plantas medicinales (Yáñez, 2014), donde algunos de ellos ejercen actividad anticancerígena, antioxidante, inmunoestimulante, antivírica, bactericida y fúngica (Sanchez, 2019). Por otro lado, las vacunas, el desarrollo de anticuerpos monoclonales (Lozada-Requena & Núñez, 2020) y el uso de bacteriófagos (Segundo-Arizmendi 2015), han adquirido gran importancia para combatir microorganismos resistentes.

De forma interesante, el trasplante de microbiota fecal ha sido una opción terapéutica para reestablecer el microbiota intestinal y protegerse de la invasión de microorganismos resistentes, sin embargo, se han encontrado algunos efectos adversos (Rodríguez de Santiago et al., 2015). La promoción del uso de prebióticos, probióticos y simbióticos, para el restablecimiento de la flora intestinal ha sido también de utilidad (Molina, 2020). Los prebióticos son componentes alimentarios que desencadenan modificaciones que estimulan el crecimiento o la actividad de bacterias específicas en el colon. Por otro lado, los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se añaden como suplementos a la dieta, promueven el desarrollo de la flora microbiana en el intestino. Los simbióticos, por su parte, combinan tanto prebióticos como probióticos en su formulación, lo que resulta en una sinergia que maximiza sus beneficios. (Martínez-González & Andreo-Martínez, 2020).

Las nanopartículas por su parte se han identificado como un nuevo enfoque para abordar este problema debido a su capacidad inherente de actividad antibacteriana de amplio espectro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Santos et al., 2020). Por ejemplo, se encontró que las nanopartículas de Oxido de Zinc inhiben *S. aureus* mientras que las nanopartículas de plata exhiben actividad antimicrobiana dependiente de la concentración contra *E. coli* y *P. aeruginosa* (Ramalingam et al., 2016). Sin embargo, los mecanismos antibacterianos detallados de las nanopartículas no se han explicado a fondo, y los mismos tipos de nanopartícula a menudo presentan efectos distintos (Nayab et al., 2023).

Es así como los PAMs aparecen como una importante y versátil alternativa para combatir infecciones causadas por microorganismos multirresistentes (Romero, 2018). Se han evaluado PAMs naturales y sintéticos como posibles agentes terapéuticos de nueva generación. Poseen

múltiples mecanismos de acción, con un amplio espectro de actividad y un bajo potencial para generar resistencia (González et al., 2017).

Péptidos antimicrobianos: Una opción con alto potencial clínico

Los PAMs fueron descritos por primera vez como parte de la defensa natural del hospedero. Ellos existen en distintos microorganismos como bacterias, hongos, animales y plantas. Estos PAMs son expresados por genes específicos del genoma y pueden ser constitutivos o inducidos por factores externos específicos (Zhang & Dong, 2022). Una vez son producidos, estos péptidos son almacenados en las células como pro-péptidos o péptidos maduros. El aislamiento de estas moléculas ha evidenciado su potencial terapéutico, pero también presentan algunas debilidades, como la baja estabilidad frente a enzimas y la baja selectividad sobre membranas celulares (Zhang & Dong, 2022; Huerta & Navarro-García, 2016). Por ello, diversos estudios están enfocados a mejorar la selectividad y estabilidad de los PAMs, algunos mediante diversas modificaciones químicas, como: acortamiento o alargamiento de las moléculas, racemización (enantiómeros) y sustituciones de aminoácidos en diferentes posiciones de la molécula (González et al., 2017). Gracias a estas modificaciones, algunos PAMs sintéticos ya han sido aprobados por la FDA y otros se encuentran en evaluación de la fase clínica (Erdem & Kesmen, 2022).

Los PAMs de origen natural son considerados la primera línea de defensa inmunológica y se sintetizan en piel, mucosas de vías aéreas y digestivas encargadas de establecer barreras de protección para la instauración de infecciones. Los PAMs naturales han mostrado un importante potencial para combatir microorganismos resistentes a los antimicrobianos disponibles, pero también presentan algunas limitaciones como su baja selectividad, disminuida estabilidad y altos costos de manufactura. Por esto, la obtención de PAMs sintéticos, diseñados a partir de secuencias naturales o diseño de novo representan una nueva generación de moléculas con alta versatilidad de estudio a nivel de laboratorio.

A pesar de su extremada diversidad en términos de longitud y composición, la mayoría de los PAMs son polipéptidos cortos (<50 residuos), en su mayoría catiónicos, con una carga neta de aproximadamente +3 y un contenido hidrofóbico superior al 42% (Mishra et al., 2017). Estas

dos últimas características (carga neta e hidrofobicidad) están directamente influenciando la capacidad anfipática de los PAMs. La anfipaticidad le confiere al AMP su flexibilidad conformacional, así como atracción electrostática entre estos PAMs catiónicos y las membranas aniónicas de los microorganismos (Zhang & Dong, 2022; Kosikowska & Lesner, 2016).

Clasificación de los PAMs

Los PAMs se pueden agrupar de acuerdo con su fuente, actividad, características estructurales y de acuerdo con la presencia de un aminoácido en abundancia.

Estructuralmente se pueden clasificar en cuatro grupos principales (Zhang & Dong, 2022):

a) Hélices alfa: Una hélice α se forma cuando el péptido se enrolla sobre sí mismo mediante puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilo COO^- del enlace peptídico del primer residuo (n) y el grupo amino NH_3 del enlace peptídico del quinto residuo ($n+4$). De esta manera, las hélices α completan una vuelta alrededor de su eje cada 3,6 aminoácidos (Fonte-Carballo et al., 2019) (Figura 3 y 6a). La mayoría de PAMs tienden a adquirir esta característica estructural, como por ejemplo las magaininas, las cuales son PAMs activos contra un amplio espectro de agentes microbianos. Estas han sido uno de los primeros PAMs ensayados clínicamente. Otro ejemplo es el péptido LL-37 el cual es un miembro de las catelicidinas obtenidas de los extractos de gránulos de neutrófilos bovinos (Xhindoli et al., 2016) y las cecropinas un tipo de PAMs activo contra bacterias Gram-negativas y/o bacterias Gram-positivas.

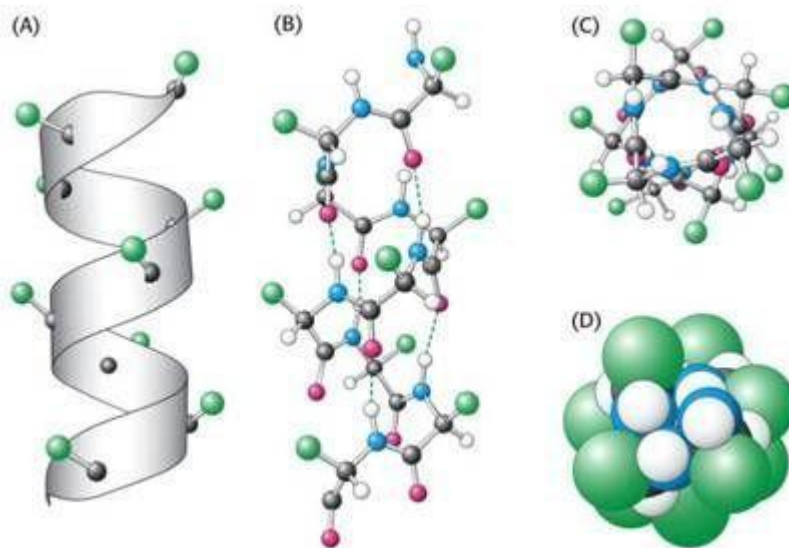


Figura 4. Vistas de la estructura α -hélice. (A) Representación cinta de ribbons, se observan los radicales expuestos hacia el exterior de la cadena, (B) estructura molecular donde se evidencian los puentes de hidrogeno que permiten la formación de la hélice, (C) vista superior, (D) modelo del espacio relleno (Gopalakrishnan et al., 2007).

El esquema de la rueda helicoidal es una representación útil para determinar las posibles interacciones de un PAM α -helical con otras moléculas. Una hélice α , se pueden catalogar hidrófoba si está constituida por residuos apolares, hidrófila cuando los residuos son polares y anfipática cuando los residuos polares se agrupan en una cara y los apolares en otra (Figura 5) (Gopalakrishnan et al., 2007)

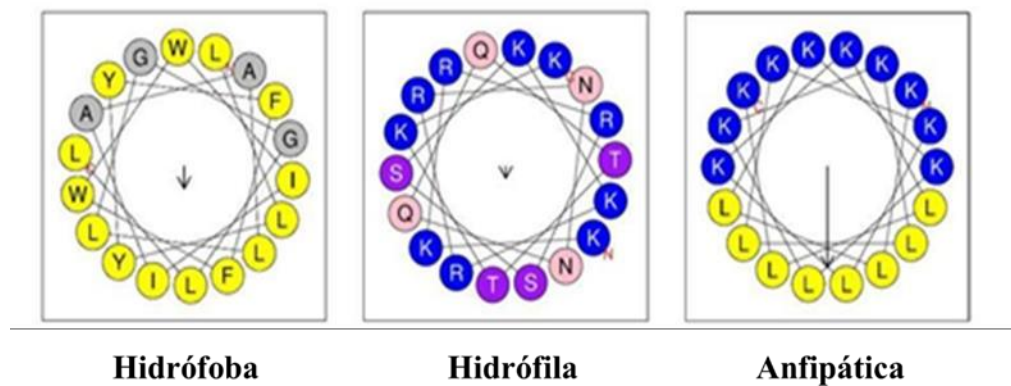


Figura 5. esquem de secuencias peptídicas en la rueda helicoidal. La proyección fue obtenida con el programa HeliQuest, donde se muestra la representación de una hélice hidrófoba, una hélice hidrófila y una hélice anfipática. Los residuos apolares se muestran en amarillo y los polares en azul. Las letras en rojo indican el extremo C terminal (C) y el extremo N terminal (N), y la flecha en el centro de la hélice indica la dirección y proporción de la cara apolar. El color rosa define aminoácidos polares sin carga (Q, N). Los residuos en gris (Hidrofobicidad intermedia), significa que pueden acomodarse en la cara polar o apolar. Elaboración propia

- b) De estructura extendida:** Son péptidos lineales catiónicos que no presentan una estructura definida (Figura 6b). En esta categoría se encuentran algunos miembros de la familia de las catelicidinas, los cuales son conocidos por tener una estructura lineal más que una estructura secundaria debido a la presencia de residuos de prolina. Dentro de esta familia se incluyen péptidos como las Indolicidinas producidas por leucocitos de bovinos de aproximadamente 13 residuos de longitud (Geitani et al, 2020).
- c) Láminas Beta:** Comparado con las hélices α , las láminas β son menos frecuentes en la conformación natural de las moléculas proteicas. Las láminas β están conformadas por dos o más hebras β , que se encuentran una junto a la otra mediante enlaces de

hidrógeno entre los grupos COO^- y NH_3^+ . Estas hebras se pueden disponer en el mismo sentido (forma paralela) o en antisentido (forma antiparalela) (Figura 6c). Dentro de los PAMs con esta estructura se encuentran las defensinas humanas que fueron descubiertas en neutrófilos humanos como pequeñas moléculas catiónicas y más tarde fueron encontradas en insectos, plantas y mamíferos (Zhang & Dong, 2022).

- d) De estructura mixta:** Son péptidos que tienen estructuras mezcladas, es decir que pueden involucrar regiones helicoidales, de hoja beta y extendidas en la secuencia (Figura 6d). Dentro de esta categoría se encuentra el péptido protegrina 1 de la familia de las catelicidinas, el cual tiene una longitud de 18 residuos y fue aislado de leucocitos de porcino con actividad antimicrobiana frente a un amplio rango de microorganismos. Particularmente esta secuencia contiene seis residuos de arginina y forma dos hebras β -antiparalelas con una β -turn (Zhang & Dong, 2022).

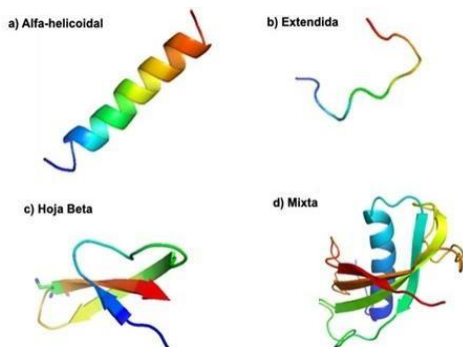


Figura 6. Clasificación de los PAMs según su estructura. Se muestra la representación esquemática de cada una de las estructuras de las PAMs. (A) hélice alfa. (B) extendida. (C) Estructura mixta. (D) Estructura de hoja beta (Sánchez & Ortega, 2016).

5.2 Mecanismos de acción de los PAMs

Es importante destacar que a diferencia de los antimicrobianos que actúan sobre actividades celulares específicas como la síntesis del peptidoglicano, síntesis de ADN o de proteínas, los PAMs actúan mayoritariamente sobre la membrana de lipopolisacáridos de los distintos microorganismos y en muy baja medida sobre blancos intracelulares (Figura 6). Esta interacción electrostática PAM-membrana provee a los PAMs con una ventaja frente a los antibióticos, resultando en una menor vulnerabilidad al desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos (Hassan et al., 2023; Naiel et al., 2023). La interacción de los PAMs con la membrana lipídica es posible gracias a su característica anfipática, lo que permite la atracción entre las cargas negativas de las membranas y la carga positiva de los residuos básicos de los PAMs. Esta interacción permite la

acumulación de péptidos al interior de la bicapa, hasta llegar a un umbral en el cual se produce el colapso y la membrana se rompe (Erdem & Kesmen, 2022). Las membranas eucarióticas con un alto contenido de colesterol y una baja carga aniónica están fuera del alcance blanco de los PAMs.

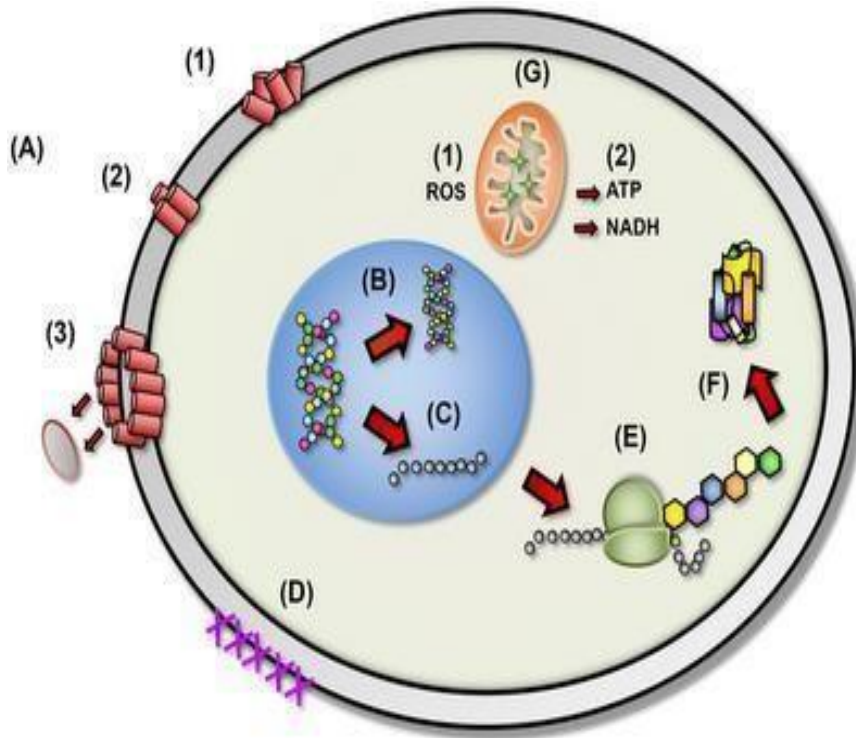


Figura 7. Mecanismos de acción de los PAMs. Se representa A. Ruptura de la membrana celular 1) modelo duela del barril, 2) modelo del agujero del gusano y 3) modelo de la alfombra, B. Inhibición de la síntesis de ADN, C. Bloqueo de la síntesis de RNA, D. Inhibición de las enzimas que sintetizan la pared celular, E Inhibición de la actividad de los ribosomas, F. Inhibición de la actividad de las chaperonas, G. 1. Inhibición de la cadena respiratoria, 2. Ruptura de la membrana mitocondrial (Barbosa et al., 2011).

Se han descrito cuatro tipos de modelos de ruptura de membrana (Erdem & Kesmen, 2022) que se describen como:

Modelo de duela de barril donde los péptidos se ubican en la membrana con los residuos hidrofóbicos orientados hacia el interior de la bicapa lipídica y los hidrófilicos orientados hacia la luz del poro (Días et al., 2022; Espinal et al., 2023).

- **Modelo de agujero de gusano o poro toroidal**, aquí los péptidos se reorientan en la membrana y arrastran a los lípidos con ellos mediante

interacciones electrostáticas. La membrana sufre un doblez y forma un poro toroidal.

- **Modelo de alfombra** donde los péptidos actúan como detergentes, cubriendo la membrana electrostáticamente (en forma monomérica u oligomérica). Esta "alfombra" de moléculas anfipáticas desplaza los fosfolípidos, alterando las propiedades de la membrana y generando su ruptura.
- **Modelo de agregado**, donde los péptidos se reorientan y se insertan dentro de la membrana verticalmente para formar estructuras similares a esferas y finalmente,
- **Modelo de adelgazamiento de la membrana** donde los AMPs se insertan a un solo lado de la bicapa lipídica formando un espacio que debe ser ocupado por los lípidos de la membrana, conduciendo a una expansión de la membrana y por lo tanto a una reducción en el espesor de la bicapa para mantener el volumen constante.

5.3 Limitaciones de los PAMs y soluciones.

Pese a sus excelentes características antimicrobianas, los PAMs presentan alta actividad citotóxica y hemolítica, esta última evidenciada por porcentajes de hemólisis altos o por concentraciones mínimas hemolíticas (CMH-concentración más baja del antimicrobiano que produce la lisis de los glóbulos rojos) bajas, las cuales son, incluso menores o iguales a la concentración mínima inhibitoria (CMI- concentración más baja del antimicrobiano que inhibe el crecimiento normal del microorganismo) de los PAMs, lo que hace muy peligroso su uso a nivel sistémico

(Hervé, 2015). Por otra parte, el aumento de los costos de producción y algunos problemas técnicos en el proceso de síntesis química limitan en algunos casos su fabricación. Así mismo, aquellos péptidos obtenidos de forma natural imponen retos para lograr siempre las mismas características naturales de producción. La estabilidad de los PAMs también se ha visto afectada por el pH, la fuerza iónica y la actividad de algunas proteasas presentes en los fluidos humanos como el suero.

Basados en estas limitaciones presentadas por los PAMs, distintos investigadores buscan mejorar la selectividad, aumentando la actividad antimicrobiana mientras se reduce significativamente la toxicidad sobre células humanas. Así mismo, se busca incrementar la estabilidad de los péptidos y reducir los costos de producción (Li et al., 2017; Luna, 2022). Con estos objetivos de estudio, el diseño racional de PAMs para lograr estos PAMs ideales se ha centrado en cinco aspectos claves: 1) longitud de la cadena; 2) carga neta; 3) hidrofobicidad; 4) anfipaticidad y 5) estructura secundaria.

Uno de los enfoques utilizados para mejorar la selectividad de los PAMs es el acortamiento de la molécula, de esta forma se reduce los costos de producción, se modifican algunas características fisicoquímicas y estructurales y se han encontrado resultados prometedores respecto al mejoramiento de la selectividad de los PAMs por membranas microbianas. Se ha reportado el incremento en la selectividad de un péptido de 25 aminoácidos, que presentaba actividad antimicrobiana sobre dos tipos de bacterias, con una hemólisis del 10%. Al acortar la molécula se obtuvo una secuencia de 11 residuos con similar actividad antimicrobiana y con reducida actividad hemolítica (1,8% la hemólisis) (Erdem & Kesmen, 2022).

Otro estudio realizado muestra que al realizar el acortamiento del péptido Pmap-36 de 36 aminoácidos, el cual es activo contra bacterias y *Cándida*, se logró obtener un PAM de 18 residuos que mantiene la actividad antibacteriana, muestra una actividad antifúngica más potente y tiene una actividad hemolítica menor, pasando de una CMH de 4 a 128 μM (Erdem & Kesmen, 2022; Li et al., 2016). En un estudio reciente Barreto Santamaría y cols. reportaron que al remover tres aminoácidos de la región N-terminal del péptido de 20 residuos 35409, lograron obtener un péptido con actividad antibacteriana similar y actividad hemolítica reducida, pasando de una CMH de 1,56 para el péptido original, a una CMH mayor a 200 μM (Barreto-Santamaría et al., 2020; Luna, 2022).

Conclusiones

- Ante el incremento de la RAM se han adoptado estrategias de búsqueda de nuevos agentes terapéuticos que combatan estos microorganismos. Dentro de los agentes investigados para este fin se encuentran los PAMs, moléculas que han generado impacto científico, económico y social debido a sus ventajas en comparación con otros agentes antimicrobianos.
- El diseño racional de PAMs esta mediado por la modificación de características fisicoquímicas como el acortamiento de secuencias o los cambios estructurales apoyados en métodos computacionales han sido herramientas utilizadas para el mejoramiento selectivo de los nuevos PAMs.
- Se deben tener en cuenta que propiedades fisicoquímicas como la anfipaticidad, la hidrofobicidad y la carga neta de los PAMs, sumado a las características estructurales, por que parecen ser las fuerzas que impulsan la interacción con la membrana citoplasmática microbiana cargada negativamente.
- Se han propuesto, que los PAMs que actúan sobre bacterias pueden ser activos contra microorganismos de más alta complejidad como los hongos. Por lo cual se propone aumentar los estudios con este microorganismo.

Referencias

- Aldama, P. C. (2019). Normas de prevención y control de brotes infecciosos intrahospitalarios (3a parte). *Acta Pediátrica de México*
<http://repositorio.pediatria.gob.mx:8180/handle/20.500.12103/3001>
- Aguirre Guataqui, K. N., Parra Giraldo, C. M., & García Castañeda, J. E. Péptidos quiméricos derivados de Lactoferricina Bovina y Buforina II: actividad antifúngica contra aislados clínicos y cepas de referencia de *Candida spp* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
- Angles, E. (2018). Uso racional de antimicrobianos y resistencia bacteriana: ¿ hacia dónde vamos?. *Revista Médica Herediana*, 29(1), 3-4.
<http://dx.doi.org/https://doi.org/10.20453/rmh.v29i1.3253>
- Ayala Iniesta, A. POLÍMEROS ANTIMICROBIANOS: NUEVAS ALTERNATIVAS EN LA TERAPIA ANTIMICROBIANA.
- Barbosa Pelegrini, P., del Sarto, R. P., Silva, O. N., Franco, O. L., & Grossi-de-Sa, M. F. (2011). Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. *Biochemistry research international*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/250349>
- Barbosa-Rengifo, M. M., Morales-Plaza, C. D., Amézquita-Abello, M. C., & Martínez-Buitrago, D. M. (2016). Vigilancia de morbilidad materna extrema en una institución de referencia en Cali, Colombia, 2013-2014. *Revista colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 67(3), 207-214.
<http://dx.doi.org/10.18597/rcog.769>
- Berdize, N., Eiró, N., González, L. O., Juan, G., & Vizoso, F. (2015). Análisis de factores celulares y moleculares de la frontera tumoral relacionados con la afectación de los ganglios centinela y no centinela en el cáncer de mama. *Revista de Senología y Patología Mamaria*, 28(4), 160-167.
<https://doi.org/10.1016/j.senol.2015.07.003>
- Boparai, J. K., & Sharma, P. K. (2020). Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein and peptide letters*, 27(1), 4–16.
<https://doi.org/10.2174/0929866526666190822165812>
- Camargo, P., & Serrano, A. (2013). Actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos 29009 y 23688 sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 35218. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia.
- Cati, L., & Rosendo, R. (2019). Factores asociados a multiresistencia antimicrobiana en neumonía intrahospitalaria Hospital Alberto Sabogal Sologuren Essalud 2017.
https://hdl.handle.net/20_500.12727/4741

- Chávez-Jacobo, V. M. (2020). La batalla coⁿtra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.202>
- Chen, C., Shi, J., Wang, D., Kong, P., Wang, Z., & Liu, Y. (2023). Antimicrobial peptides as promising antibiotic adjuvants to combat drug-resistant pathogens. *Critical reviews in microbiology*, 1–18. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2023.2186215>
- Correa Armijos, C.A. (2019) Incidencia de resistencia bacteriana en pacientes con bacteriemia en el hospital teófilo dávila en el año 2018 (examen complexivo). UTMACH, Unidad Académica de Ciencias Químicas Y De La Salud, Machala, Ecuador. 29 p. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/13816>
- Cowan, M. K. (2018). *Microbiology: a systems approach*: McGraw-Hill.
- Cubas Alberca, N. L., & Huaripata Vásquez, Y. E. (2019). Susceptibilidad Bacteriana en Cultivos de Pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos en el Hospital Regional Docente de Cajamarca, 2016- 2018. <http://repositorio.unj.edu.pe/handle/UNJ/355>
- Dias, L. M., Ferrisse, T. M., Medeiros, K. S., Cilli, E. M., & Pavarina, A. C. (2022). Use of Photodynamic Therapy Associated with Antimicrobial Peptides for Bacterial Control: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International journal of molecular sciences*, 23(6), 3226. <https://doi.org/10.3390/ijms23063226>
- Espinal, P., Fusté, E., Sierra, J. M., Jiménez-Galisteo, G., Vinuesa, T., & Viñas, M. (2023). Progress towards the clinical use of antimicrobial peptides: challenges and opportunities. *Expert opinion on biological therapy*, 23(7), 641–650. <https://doi.org/10.1080/14712598.2023.2226796>
- Erdem Büyükkiraz, M., & Kesmen, Z. (2022). Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. *Journal of applied microbiology*, 132(3), 1573–1596. <https://doi.org/10.1111/jam.15314>
- Fernández-Cuenca, F., Martínez-Martínez, L., Pascual, Á., Grupo, G. R. A. M., Garduño, E., Pérez, P. H., ... & Rubio, C. M. (2020). Evolución de la resistencia antimicrobiana en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de infecciones invasivas en el sur de España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 38(4), 150-154. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.06.009>
- Fonte-Carballo, L., González-Paramas, A. M., Cruz, D. R. D., Diaz-Solares, M., Morales-Querol, D., González-Sierra, L., & Lugo-Morales, Y. (2019). Quantification of free proline in the diet of the stingless bee livestock of the Matanzas and Mayabeque provinces. *Pastos y Forrajes*, 42(3), 204-208. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_serial&pid=0864-0394&lng=es&nrm=iso

- Geitani, R., Moubareck, C. A., Xu, Z., Karam Sarkis, D., & Touqui, L. (2020). Expression and Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Defense of Airway Mucosa: Potential Implication in Cystic Fibrosis. *Front Immunol*, 11, 1198. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01198>
- González García, M., San Juan Galán, J., Morales Vicente, F. E., & Otero González, A. J. (2017). Péptidos antimicrobianos: potencialidades terapéuticas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(2), 01-13.
- González García, M., San Juan Galán, J., Morales Vicente, F. E., & Otero González, A. J. (2017). Péptidos antimicrobianos: potencialidades terapéuticas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(2), 01-13.
- Gómez Jiménez, M. (2020). Evaluación de la actividad Antimicrobiana de péptidos cortos derivados del péptido 23688 sobre algunos microorganismos de importancia clínica (Doctoral dissertation, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca).
- Gopalakrishnan, S., Chakraborty, A., & Mahapatra, D. R. (2007). Spectral finite element method: wave propagation, diagnostics and control in anisotropic and inhomogeneous structures: Springer Science & Business Media.
- Guirao, J. (2016). Acción de validamicina A y los antifúngicos de uso clínico, micafungina y anfotericina B, sobre *Candida albicans* (Doctoral dissertation, Universidad de Murcia). <http://hdl.handle.net/10201/49939>
- Hassan, F. F., Al-Aamery, R. A., & Mahdi, S. S. (2023). A systematic review of Antimicrobial peptides and their current applications. *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology*, 30(6), 337-343.
- Hervé, B. (2015). Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico: automatización y algunas aplicaciones en identificación microbiana y estudio de susceptibilidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(6), 753-763. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.11.004>
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2008.00347.x>
- Huerta-Cantillo, J., & Navarro-García, F. (2016). Properties and design of antimicrobial peptides as potential tools against pathogens and malignant cells. *J Investigación en Discapacidad*, 5(2), 96-115.
- Instituto Nacional de Salud. (2022). Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA).
- Instituto Nacional de Salud. (2023). Lineamientos nacionales de vigilancia en salud. <file:///C:/Users/ASUS/Downloads/Lineamientos%20Nacionales%20INS%202023.pdf>
- Ioannou, P., Baliou, S., & Kofteridis, D. P. (2023). Antimicrobial Peptides in Infectious Diseases and Beyond-A Narrative Review. *Life* (Basel, Switzerland), 13(8), 1651. <https://doi.org/10.3390/life13081651>

- Karp, B. E., Tate, H., Plumblee, J. R., Dessai, U., Whichard, J. M., Thacker, E. L., ... & McDermott, P. F. (2017). National antimicrobial resistance monitoring system: two decades of advancing public health through integrated surveillance of antimicrobial resistance. *Foodborne pathogens and disease*, 14(10), 545-557. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2283>
- Kosikowska, P., & Lesner, A. (2016). Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003-2015). *Expert Opin Ther Pat*, 26(6), 689-702. doi:10.1080/13543776.2016.1176149.<https://doi.org/10.1080/13543776.2016.1176149>
- la Fuente-Salcido, D., Margarita, N., Villarreal-Prieto, J. M., Díaz León, M. Á., & García Pérez, A. P. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 46(2), 7-16.
- Li, J., Koh, J. J., Liu, S., Lakshminarayanan, R., Verma, C. S., & Beuerman, R. W. (2017). Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. *Front Neurosci*, 11, 73. doi:10.3389/fnins.2017.00073.
- Li, Q., Quan, L., Lyu, J., He, Z., Wang, X., Meng, J., & Li, H. (2016). Discovery of peptide inhibitors targeting human programmed death 1 (PD-1) receptor. *Oncotarget*, 7(40), 64967. doi: 10.18632/oncotarget.11274
- Li, X., Zuo, S., Wang, B., Zhang, K., & Wang, Y. (2022). Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(9), 2675. <https://doi.org/10.3390/molecules27092675>
- Lozada-Requena, I., & Núñez Ponce, C. (2020). COVID-19: respuesta inmune y perspectivas terapéuticas. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 37, 312-319. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.372.5490>
- Luna, S. A. M (2022). Determinación de la Actividad Antimicrobiana de los Péptidos Ib-M Frente a. *Revista de Educación Bioquímica*, 25(2), 41-49.
- Martínez-González, A. E., & Andreo-Martínez, P. (2020). Prebióticos, probióticos y trasplante de microbiota fecal en el autismo: una revisión sistemática. *Revista de Psiquiatría y Salud Mental*, 13(3), 150-164. <https://doi.org/10.1016/j.rpsm.2020.06.002>
- McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology spectrum*, 6(2), 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>
- Mishra, B., Reiling, S., Zarena, D., & Wang, G. (2017). Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies. *Current opinion in chemical biology*, 38, 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.03.014>

- Mitchell, M. E. V., Alders, R., Unger, F., Nguyen-Viet, H., Le, T. T. H., & Toribio, J. A. (2020). The challenges of investigating antimicrobial resistance in Vietnam - what benefits does a One Health approach offer the animal and human health sectors?. *BMC public health*, 20(1), 213. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-8319-3>
- Molina Garcés, D. D. (2020). Caracterización de la microbiota de un producto probiótico (Bachelor's thesis, Quito). <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/8739>
- Mora, A., & Fabián, R. (2019). Determinación de la actividad anti fúngica de extractos de lantana camara frente a cándida albicans (Bachelor's thesis, Quito: UCE). <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/18820>
- Morrison, L., & Zembower, T. R. (2020). Antimicrobial Resistance. *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America*, 30(4), 619–635. <https://doi.org/10.1016/j.giec.2020.06.004>
- Naiel, M. A., Ghazanfar, S., Negm, S. S., Shukry, M., & Abdel-Latif, H. M. (2023). Applications of antimicrobial peptides (AMPs) as an alternative to antibiotic use in aquaculture—A mini-review. *Annals of Animal Science*, 23(3), 691-701.
- Nayab, S., Aslam, M. A., Rahman, S. U., Sindhu, Z. U. D., Sajid, S., Zafar, N., ... & Amanullah. (2022). A review of antimicrobial peptides: its function, mode of action and therapeutic potential. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 28(1), 46.
- OMS. (2017) OMS: Bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Recuperado de https://www.3tres3.com/ultima-hora/oms-bacterias-para-las-que-se-necesitan-urgentemente-nuevos-antibioti_37713/
- Oliveros, J. P. B., Vairo-Cavalli, S., & Malbrán, I. (2023). Actividad antifúngica de péptidos antimicrobianos de *Silybum marianum* sobre el hongo fitopatógeno *Fusarium graminearum*, agente causal de la fusariosis de la espiga de trigo. *Investigación Joven*, 10(3), 123-124.
- Pérez López, E. M. (2019). Problemática actual de las enterobacterias productoras de carbapenemasas. [Trabajo de revisión bibliográfica, Grado en Medicina, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko]. https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/43724/TFG_Perez_Lopez_Elena_Maria.pdf
- Porras Díaz, Y. N., & Salgado García, D. X. Perfil de susceptibilidad in vitro de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos frente a colistina, tigeciclina y fosfomicina. repository.javeriana.edu.co. <http://hdl.handle.net/10554/42917>
- Quiñones Pérez, D. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(3), 1-17.
- Ramalingam, B., Parandhaman, T., & Das, S. K. (2016). Antibacterial Effects of Biosynthesized Silver Nanoparticles on Surface Ultrastructure and Nanomechanical Properties of Gram-Negative

Bacteria viz. *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS applied materials & interfaces*, 8(7), 4963–4976. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b00161>

Rodríguez de Santiago, E., García García de Paredes, A., Ferre Aracil, C., Aguilera Castro, L., & López San Román, A. (2015). Trasplante de microbiota fecal: indicaciones, metodología y perspectivas futuras. *Rev. argent. coloproctología*, 225-234. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-973157>

Rodríguez, P. N. (2019). Mecanismos de resistencia a azoles en especies de *Candida non-albicans* (Doctoral dissertation, Universitat Rovira i Virgili).

Rojas, G. C., & Ulate, L. A. (2017). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 73(621), 757-763. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=69870>

Romero García, J. L. (2018) Resistencias a diferentes antimicrobianos en cepas bacterianas procedentes de pescado.[internet]. Jaén: Universidad de Jaén; 2018 [citado 2021 May 17]. <https://hdl.handle.net/10953/922>

Sánchez, A. T., & Ortega, T. d. J. A. J. N. (2016). Carne y productos cárnicos como fuente de péptidos bioactivos. *10(2)*, 49-58.

Sanchez Perez, J. A. (2019). Actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus* sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*-Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión” UNMSM. <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v8i2.16170>

Santos, N., Anzola, Y., Forero, S., Forero, W., & García, J. (2020). Cuatro tendencias nanotecnológicas que revolucionarán la medicina en Colombia. *Revista Matices Tecnológicos*, 11. Vol. 11 (2019):

Segundo-Arizmendi, N., Hernández-Baltazar, E., Villegas, O., & Torres-Angeles, O. (2015). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia).

Tang, K. W. K., Millar, B. C., & Moore, J. E. (2023). Antimicrobial Resistance (AMR). *British journal of biomedical science*, 80, 11387. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387>

Vanzolini, T., Bruschi, M., Rinaldi, A. C., Magnani, M., & Fraternali, A. (2022). Multitalented Synthetic Antimicrobial Peptides and Their Antibacterial, Antifungal and Antiviral Mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 23(1), 545. <https://doi.org/10.3390/ijms23010545>

Vargas-Flores, T., & Kuno-Vargas, A. (2015). Morfología bacteriana. http://metabase.uaem.mx/bitstream/handle/123456789/1466/280_2.pdf

- Xhindoli, D., Pacor, S., Benincasa, M., Scocchi, M., Gennaro, R., & Tossi, A. (2016). The human cathelicidin LL-37--A pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator. *Biochimica et biophysica acta*, 1858(3), 546–566. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.003>
- Yánez Arcos, G. I. (2014). Investigación de la actividad antimicrobiana y fitoquímica de extractos de plantas medicinales frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans* (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica). <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/8462>
- Zhang, R., Xu, L., & Dong, C. (2022). Antimicrobial Peptides: An Overview of their Structure, Function and Mechanism of Action. *Protein and peptide letters*, 29(8), 641–650. <https://doi.org/10.2174/0929866529666220613102145>

Heces de *Columba livia* y su relación con criptosporidiosis³⁴

Ruth Páez Díaz³⁵
Ligia Consuelo Sánchez Leal³⁶
Johanna Marcela Moscoso Gama³⁷
Martha Lucía Posada Buitrago³⁸

Resumen

La Criptosporidiosis es una enfermedad producida por el protozoario *Cryptosporidium spp.* que se encuentra en animales vertebrados y en el hombre. Su presencia está asociada a la convivencia entre unos y otros por actividades de compañía, de producción o de vida silvestre. El parásito ha sido detectado en las especies de palomas *Columba livia* y se ha visto su presencia en individuos inmunosuprimidos e inmunocompetentes, en quienes causa diarrea aguda. En Bogotá, hay una alta población de esta especie de palomas lo cual permite inferir sobre una posible zoonosis emergente potencial. En el presente capítulo, se describe la fundamentación teórica del proyecto.

³⁴ Proyecto de investigación: Identificación de *Cryptosporidium spp.* en heces de paloma *Columba livia* en puntos críticos de concentración poblacional de palomas en la ciudad de Bogotá, Colombia.. Grupo de investigación: Ceparium.

³⁵ Magister en Educación, Universidad Militar Nueva Granada. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Docente ocasional Tiempo Completo. Correo electrónico: rpaezd@unicolmayor.edu.co

³⁶ Magister en Biología, Universidad Militar Nueva Granada. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Docente de Planta Tiempo Completo. Correo electrónico: lconsuelosanchez@unicolmayor.edu.co

³⁷ Magister en Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Docente ocasional Tiempo Completo. Correo electrónico: jperpe@unicolmayor.edu.co

³⁸ Doctorada en Microbiología, Universidad Complutense de Madrid. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Docente de Planta Tiempo Completo. Correo electrónico: mlposada@unicolmayor.edu.co

Palabras claves: Criptosporidiosis, *Columba livia*, protozoarios, potencialidad enzootica.

Criptosporidiosis: generalidades de *Cryptosporidium* spp en *Columba livia*

Algunas enfermedades producidas por patógenos emergentes se han asociado a escenarios sociodemográficos, de marginación y de orden público en Colombia, adicionalmente, existe limitación de actividades de vigilancia en salud pública y prevención de enfermedades (Monsalve 2009). Esta situación predispone la presencia de agentes infecciosos y su transmisión entre especies, situación que se confirma con el reporte de nuevas enfermedades infecciosas que están relacionadas con la transformación del hábitat de animales silvestres a causa de la urbanización, el crecimiento global de la población, deforestación, adaptabilidad microbiana y una infraestructura frágil en salud que debilita las acciones de salud pública (Cook RA, et al.,2012).

La intervención del hombre llevó a que algunas especies silvestres como las palomas fueran domesticadas y usadas para recreación, deporte y como fuente proteica. Esta estrecha interacción con el ser humano ha conllevado a una adaptación sinantrópica de las palomas (Batiste Et al., 2010), adaptándose a condiciones ambientales de zonas urbanas para su supervivencia (F.V 2017). Además, convirtiéndose en un potencial zoonótico debido a una posible trasmisión de enfermedades entre especies e incluso al ser humano. Estas palomas descienden filogenéticamente de la *Paloma bravia* que habitaba originalmente en Europa, Asia y África en grupos no muy numerosos alrededor de zonas específicas como los acantilados. Ingresó a América hacia el siglo XVI y se volvió de vida libre.

Particularmente, en Colombia se han reportado varios puntos críticos de presencia de palomas (*Columba livia* domestica): sensibilidad alta (200 palomas), sensibilidad media (entre 10 y 200 palomas) y sensibilidad baja (10 palomas) (IPB 2019), donde se enmarca la necesidad de examinar la presencia de protozoarios principalmente con potencialidad zoonótica como *C.parvum*, *C. meliagridis*, *C. baileyi*, los cuales se han reportado aisladamente en palomas y humanos de países diferentes a Colombia, encontrándose que estos tienen varios reservorios y su transmisión principal es el agua, en la cual sobreviven por largo tiempo. Investigadores han abordado varios aspectos de la criptosporidiosis entre humanos y animales (Ramirez 2004), pero la literatura sobre la incidencia de la infección por *Cryptosporidium* spp es escasa.

Importancia de *Cryptosporidium* spp

En la salud humana, las zoonosis representan en la actualidad uno de los mayores problemas a nivel mundial debido a que el humano ingresa en forma permanente a hábitat particulares en donde hay abundancia de animales silvestres que al verse desplazados tienen que luchar por su supervivencia como cualquier ser vivo. Esto significa que cada vez es más frecuente el problema de enfermedades que tienen una incidencia en la Salud pública tanto en las zonas rurales como en las urbanas. Las palomas de la especie *Columba livia* son animales que originalmente estaban clasificadas como salvajes o silvestres, pero con las acciones antrópicas esta especie pasó a ser un animal doméstico.

Aunque la mayor problemática del exceso de población de palomas en las ciudades es por el daño que causan en la propiedad pública y privada porque sus asentamientos son masivos, el verdadero problema en la salud pública es que ellas son portadoras de patógenos que pueden enfermar a quienes tienen contacto casi permanente en parques y espacios recreativos y que generalmente son niños, ancianos, y otras personas que tienen unas características inmunológicas que los colocan en condiciones de inmunocompromiso (Xiao 2004). En este sentido, toma importancia dentro del concepto de Una Salud o “One Health” en inglés porque patógenos que han sido encontrados en ella como el *Cryptosporidium* spp tiene una incidencia en humanos que conlleva costos para la salud.

Antecedentes de la presencia de *Cryptosporidium* spp

Uno de los patógenos que ha sido identificado en varios países del mundo en *Columba livia* es el *Cryptosporidium*. Se ha confirmado la presencia de *Cryptosporidium* spp en humanos, con prevalencias que varían así: en niños entre 8,1% y 49,2% (Helmy 2014) y adultos inmunocomprometidos entre 25% y 74,3% (Omoruyi et al., 2014). Igualmente, en adultos inmunocompetentes se ha presentado entre 14% y 88,9% (Omoruyi et al., 2014). Adicionalmente, se asocia con factores de riesgo ante la presencia de infección y desarrollo de síntomas, relacionado según diversos autores a la infección por *Cryptosporidium* spp principalmente reportados en estados inmunosupresores, deficiencia en hábitos de higiene, bajas condiciones sanitarias, consumo de alimentos con fallas en la manipulación, agua de consumo humano no ozonificada, pobreza y el contacto directo con animales entre otros (Usluca 2011).

En Colombia, especialmente en las grandes ciudades, el problema por el exceso de población *Columba livia* es evidente. En el estudio realizado por Méndez et al, 2013 se determinó que en las heces secas acumuladas de las palomas se han encontrado

parásitos (Pereira et al, 2011). Teniendo en cuenta que la presentación de patologías principalmente zoonóticas que circulan entre las poblaciones animales y humanas tienen transmisión directa o indirecta y son cada vez más frecuentes en el mundo, se hace necesario seguir investigando su presencia y los factores de riesgo para la salud humana en Bogotá. Por ello, se debe tener en cuenta el potencial zoonótico de algunas especies de protozoarios reportadas en palomas como *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium meleagridis*, así como la transmisión a nuevas especies animales incluyendo la humana. Esto debido a los cambios sociodemográficos, climáticos, calentamiento global, deforestación y urbanización que impacta la supervivencia de la especie hospedero y genera problemas en la salud ambiental, la sanidad animal y la salud pública (Pace 2009).

Esto lleva a un trabajo interdisciplinar, situación que se enmarca dentro del concepto de “Una Salud” conectada a la salud humana, animal y ambiental, donde es necesario un equipo multidisciplinar para realizar acciones desde la identificación del patógeno y toda su relación socio ambiental, como base para crear mejores estrategias para su control y vigilancia, y para ser incluidas dentro de políticas sanitarias de parásitos olvidados, principalmente por el desconocimiento de la patogenicidad y transmisión de *Cryptosporidium* spp.

El papel de esta zoonosis se subestima, razón por la cual hay un conocimiento limitado sobre su epidemiología, el análisis para su diagnóstico, y el subregistro, a pesar de tener en cuenta el conocimiento y reporte en ciertas regiones o países (Araujo et al., 2011). Esto hace necesaria la búsqueda de protozoarios principalmente con potencialidad zoonótica y establecer los factores de riesgo al que puedan estar expuestos tanto animales como el hombre, a través de la identificación y caracterización de protozoarios como *C. parvum*, *C. meliagridis*, *C. baileyi*, los cuales se han reportado con mayor frecuencia o reportes aislados, en aves, pero no en heces de palomas y también aisladas en humanos (Mattsson et al, 2011).

***Cryptosporidium* spp**

La criptosporidiosis es una enfermedad infecciosa principalmente gastrointestinal, que se estudia con más frecuencia en los últimos 20 años, la cual produce diarreas moderadas a graves en animales y humanos, de relevancia médica en forma de parásito oportunista y cuya fuente de transmisión más frecuente para seres vivos son las aguas contaminadas con este protozoario (Tandon 2014).

El artículo de revisión desarrollado por Tzipori indica que Ernest Edward Tyzzer en 1907 por primera vez descubre microorganismos en ratones de *Cryptosporidium*. Luego en 1980, hallaron brotes de carácter gastrointestinal, en animales de producción jóvenes, como bovinos y ovinos por cryptosporidiosis. Al realizar su identificación, se observó la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* y concluyeron que este parásito es el causante de 4 a 7% de cuadros agudos gastrointestinales en humanos. En la década de 1990, se logró extraer el material genético, secuenciar e identificar diferentes especies de *Cryptosporidium*, contribuyendo a un gran hallazgo en la rama de la parasitología (Tzipori 2008).

Etiología y antecedentes

El término *Cryptosporidium* viene de Krypto = escondido, spor = espora, idium = pequeño (Appelbee 2005).

La presencia de *Cryptosporidium* en humanos, fue reconocida por primera vez en 1976 y se generó gran importancia de este en las décadas de los 80s y 90s por presentarse como enfermedad diarreica grave en pacientes con SIDA. Sus ooquistes como forma infectante, que se caracterizan por tener una pared gruesa, ser resistentes al cloro, su baja dosis infectiva, su desarrollo infeccioso y su potencial zoonótico, lo han convertido desde entonces en una amenaza para los humanos y los animales, a través del consumo de aguas y alimentos contaminados o condiciones insalubres. Además, desde que Tyzzer lo descubrió en 1907 y hasta los años 70 ha sido poco descrito, en aproximadamente 20 individuos de grupos de vertebrados y los primeros casos de criptosporidiosis se reportaron en humanos hacia 1976 (Dillingham *et al.*, 2002).

La investigación realizada por Nina *et al.*, 1992 evidenció *C. parvum*, es una de las especies de *Cryptosporidium* spp que afecta más a mamíferos, entre ellos humanos, bovinos y ovinos (McDonald *et al.*, 1992). En este artículo se encontró que existen diferencias en el perfil antigénico de los ooquistes aislados en muestras fecales de pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), bovinos y ovinos, lo que provoca diferentes grados de susceptibilidad en los hospedadores, a pesar de que en todos los mamíferos que infecta causa diarrea, en paciente humanos con SIDA puede provocar la muerte.

Thompson *et al.* 1998, establecen las ventajas y desventajas de las técnicas de reacción en cadena de Polimerasa (PCR) descritas para la época, con las cuales se logró materializar la identificación de *Cryptosporidium parvum* en muestras clínicas y ambientales (Morgan *et al.*, 1998). Para la detección de este parásito, se hizo una amplificación de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) de muestras clínicas y de 10 ooquistes. Se realizó un procesamiento de 10 a 20 muestras, para diferenciar directamente entre todos los genotipos, cepas de *C. parvum* que son patógenas en humanos. Actualmente, los métodos de biología molecular son la forma más efectiva para la identificación de este protozooario.

Así mismo, los aspectos de su biología que permanecen confusos, en los últimos años su filogenética con varios microorganismos ha sido la principal línea de investigación para muchos investigadores, debido al interés e inesperados resultados de los primeros estudios de este Apicomplexa.

Biología y características de Cryptosporidium spp

Este género de *Cryptosporidium*, perteneciente al phylum *Apicomplexa*, se ha reagrupado filogenéticamente en la clase Gregarinasina, con los que comparte una relación monofilética que afecta gran variedad de hospederos vertebrados (Leander 2003). Igualmente, especies de este género que fueron incluidas como parásitos intracelulares obligados y de la subclase Coccidia, se reclasificaron en la subclase Gregaria, por desarrollarse en medios libres fuera de la célula su ciclo de vida (Ryan *et al.*, 2016).

La posición exacta de las gregarinas con respecto a *Cryptosporidium* y otros Apicomplexa, de acuerdo con la congruencia de genes de pequeña unidad ribosomal de ácido ribonucleico (SSUrDNA y B-tubulina) entre sí y con los datos morfológicos ponen a las gregarinas en un mismo contexto filogenético (Leander 2003).

Por otra parte, observaron características que diferenciaban a *Cryptosporidium*, como fueron: su localización al interior de la célula del huésped, en la cual sus etapas endógenas están situadas en la superficie apical de las células epiteliales y de forma intracelular, pero extracitoplasmáticas; se forma una unión multimembranosa (organelo

alimentador bajo la vacuola parasitófaga) entre la unión del parásito y la célula hospedadora; presenta dos tipos de oocistos, unos de pared delgada (responsables de la autoinfección) y otros de pared gruesa. Estos últimos oocistos inician el ciclo de vida por ser el estadio infeccioso (Carreno *et al.*, 1998).

Taxonomía

Dominio: Eucariota

Reino: Protista

Phylum: Apicomplexa

Superphylum: Alveolata (colpodélidos)

Clase: *Gregarinasina*

Orden: Cryptogregarinorida

Subclase: Gregarinasina

Clase: Conoidasida

Familia: *Cryptosporidiidae*

Género: *Cryptosporidium*

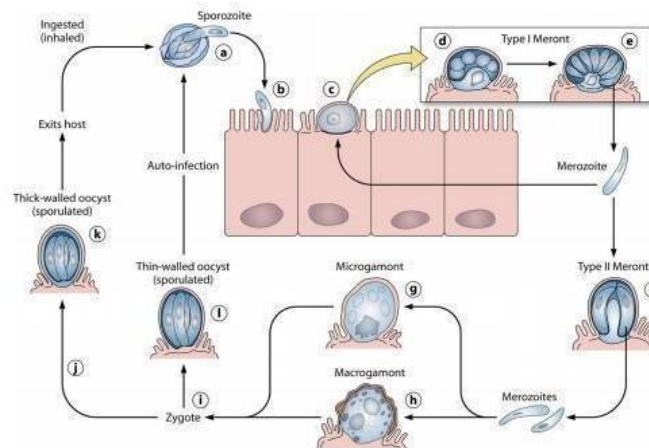
Ciclo de vida y modo de infección en el hospedero

El ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp (Figura 1.) se caracteriza por ser monoxeno, es decir el parásito lleva a cabo su desarrollo en el epitelio intestinal de un solo huésped. Una vez ingeridos los ooquistes maduros se inicia el ciclo de vida en el lumen intestinal del huésped, donde se liberan los esporozoitos del ooquiste e invaden los enterocitos formando la vacuola parasitófora (intracelular-extracitoplasmática (epicelular) ya que el parásito permanece en el borde de las micro-vellosidades intestinales) en la capa de la célula epitelial. Factores como cambios en el pH, sales biliares, enzimas pancreáticas y temperatura favorecen el desenquistamiento del ooquiste (Pereira 2011). Entre las 48 y 72 horas siguientes

en la vacuola parasitófora el esporozoito se convierte en trofozoíto dando inicio a la multiplicación asexual (merogonia o esquizogonia) como resultado se producen merontes o esquizontes de tipo I, los cuales liberan merozoitos tipo I que invaden más enterocitos y continúan formando merontes tipo I o merontes tipo II (Pereira 2011).

La reproducción sexual (gametogonia) por su parte tiene como resultado microgametos y macrogametos, una vez los macrogametos son fecundados por los microgametos se producen ooquistes capaces de esporular e infectar de nuevo al huésped (Matos 2004). Existen dos tipos de ooquiste (ooquistes de pared delgada/ooquistes de pared gruesa) ambos tipos contienen los esporozoitos infectivos, sin embargo, los ooquistes de pared gruesa representan el 80% y son más resistentes y los ooquistes de pared delgada representan el 20% y estaría implicados en la autoinfección ya que se pueden romper en el interior del huésped (Pereira 2011).

Figura 1. Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp



Tomado de Abreu-Acosta *et al.*, 2009 (Abreu-Acosta *et al.*, 2009).

Como se describió anteriormente, *Cryptosporidium* posee distintas formas parasitarias durante su ciclo de vida, sin embargo, hay dos de las cuales son de vital importancia, ya

que son necesarias para invadir al huésped, como lo es el ooquiste, y para la penetración en el enterocito, como lo es el esporozoito.

✓ Esporozoito

Es la forma la cual es capaz de penetrar dentro del enterocito para posteriormente iniciar el ciclo de reproducción 46. Esta forma parasitaria suele tener forma de medialuna o de arco, con el extremo anterior ligeramente puntiagudo y el posterior redondeado. Miden en promedio 4,9 por 1,2 μm . Cada esporozoito contiene un núcleo prominente en el tercio posterior del cuerpo. Genéticamente, posee un genoma de 9 millones de pares de bases y 8 cromosomas 47. En la gráfica, se muestra cómo se involucran las distintas moléculas que interactúan con el huésped, para la posterior penetración en el enterocito según Lendner *et al* 2014.

✓ Ooquiste

Arquitectura y composición del ooquiste según el modelo actual, muestra que el ooquiste está cubierto por un glicocálix que altera la movilidad electroforética y se muestra inmunogénico. La alta resistencia es proporcionada por una bicapa lipídica que protege contra la infiltración de líquidos y una capa rica en proteínas que le confiere resistencia mecánica. Los esporozoítos están conectados a la pared del ooquiste por filamentos que contienen glicoproteínas que desempeñan un papel en la adhesión y la invasión de la célula huésped, como las mostradas en la tabla anterior (Khurana *et al.*, 2019).

Características generales

El *Cryptosporidium* cuya forma infectiva es el ooquiste de forma esférica u ovoide y un cuerpo residual central, presentando una pared delgada y otros gruesa, relacionado con diferentes vías de desarrollo esporogónico y de infección. Esta pared, en la cual se visualiza al microscopio electrónico tres capas: una de 5 nm de espesor, con abundante material filamentoso y glicoproteínas ácidas, esta puede ser eliminada de forma parcial por contacto con hipoclorito de sodio, luego a 5nm de esta se encuentra una capa electrodensa central rígida de 10 nm de espesor con

material lipídico, la cual le da la propiedad de ácido alcohol resistente y por último una capa interna glucoproteica de 20 nm de espesor. Este género presenta una gran diferencia frente a los demás ooquistes que es una línea de sutura en su pared, que permite la salida de los esporozoitos en el proceso de desenquistamiento (Van Zeeland 2008).

Además, esta pared del ooquiste es abundante en uniones disulfuro, para conservar la capacidad infectiva del parásito. Estos ooquistes son viables entre 4°C y 22°C e incluso pueden sobrevivir a -20°C, pero temperaturas altas como una congelación rápida pueden degradarlos en poco tiempo.

En cuanto a lo esporozoitos, estos en su superficie presentan más de 20 proteínas: glicoproteínas 15/40, CSL y 900; Gal/GaINAc lectina, proteínas TRAP-C1, Cp23, Cp15, y Cp47, con acciones como adherencia e invasión a la célula huésped. Por otro lado, las roptrias, micronemas y gránulos densos forman el llamado complejo apical. Estas estructuras contienen una mezcla compleja de proteínas secretadas en el extremo apical del zoíto, cuya función como la adhesión a la célula específica del huésped, locomoción, desplazamiento y conformación de vacuola parasitófora, nicho ecológico del parásito.

En resumen, se distinguen varias características del género *Cryptosporidium* que lo diferencian de los demás coccidios como son: especificidad relativa del huésped, propiedad de autoinfección endógena, ubicación en la célula hospedera intracelular, pero extracitoplasmática y resistente a antiparasitarios.

Identificación de Cryptosporidium spp

Con relación a los métodos diagnósticos disponibles para la identificación de *Cryptosporidium* en muestras clínicas o ambientales, se conocen técnicas parasitológicas convencionales, métodos inmunológicos y de biología molecular. Khurana *et al.*, en 2018 describen aquellos procedimientos para la identificación y diagnóstico de la criptosporidiosis en el laboratorio (Gomez 2005). Uno de los principales métodos de identificación es la microscopía, a través de un montaje en fresco de muestras como heces conservadas en formalina al 10%, donde se observan ooquistes del parásito como un cuerpo liso, incoloro y esférico, con un tamaño entre 3 a 8 µm, la sensibilidad del montaje en fresco puede aumentar al combinarse con técnicas previas como el método de flotación de sacarosa de

Sheather, flotación de sal saturada y el método de formol-éter de Allen y Ridley. Para la recuperación de ooquistes por sedimentación los autores recomiendan una velocidad de centrifugación mayor de $1200 \times g$.

También mencionan la “separación inmunomagnética” donde los epítopes de los ooquistes expuestos en la superficie se adhieren a las perlas magnetizables que están recubiertas con anticuerpos monoclonales (mAbs). El complejo de bolas y ooquistes se concentra y luego en presencia de una fuerza magnética a medida que el complejo es atraído hacia el lado del tubo de ensayo; posteriormente, se aspira el fluido de suspensión y se agrega la solución ácida para liberar los ooquistes concentrados y purificados. Otro método que se menciona, es el de la tinción con ZN modificado, donde el ooquiste aparece como esferas rojas sobre el fondo verde pálido. El azul de metileno y safranina tiñe los ooquistes de color naranja brillante y puede usarse en lugar de la tinción de ZN, también recomiendan la tinción fluorogénica auramina-fenol como alternativa. Métodos inmunológicos como la detección de antígenos usando anticuerpos marcados con fluorescencia y enzimas (técnica ELISA) son usados frecuentemente. Finalmente resaltan actualmente el uso de PCR como el método más rápido y confiable para la identificación de *Cryptosporidium*. También es importante mencionar la copro preservación de muestras para un posterior aislamiento de DNA, con una condición de mayor sensibilidad, corresponde a la preservación por congelamiento de las muestras a -20°C , al realizar la PCR y obtener el 100% de muestras positivas previamente confirmada la presencia de *Cryptosporidium* por microscopia, seguida de la preservación con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (dicromato de potasio) al 2.5% a 4°C con un 80% de recuperación a los 10 días de preservación (Gómez 2005).

Tratamiento de Cryptosporidium spp

Para realizar el tratamiento es necesario confirmar el diagnóstico en las aves afectadas, así como es importante realizar su prevención. Los fármacos efectivos terapéuticamente que se han encontrado son los aminoglucósidos, los antibióticos macrólidos e ionóforos, la halofuginona, la nitazoxanida y el toltrazuril. Por ello, la paromomicina, antibiótico macrólido de amplio espectro, ha sido el primer fármaco eficaz para el tratamiento de la criptosporidiosis (intestinal) en humanos, ganado y aves de corral, siendo usualmente rápida su respuesta. Para prevenir la propagación de la enfermedad, la identificación de la fuente contaminante es importante, así como, las medidas de higiene adecuadas y la cuarentena para implementar protocolos (Toro 2000).

***Columba livia* y su relación con criptosporidiosis**

Gómez *et al.*, 2005 observaron diversas características relacionadas con las condiciones de vida de la especie *Columba livia* (Gmelin, 1789). En esta investigación se encuentra información acerca de la taxonomía, ciclo reproductivo y demás aspectos de desarrollo y costumbres propias de la vida de estas aves, que permite entender las condiciones en las cuales se desarrollan las palomas en el entorno próximo, en el cual pueden ser encontrados los especímenes para la posterior recolección de muestras (González 2007).

El nombre *Columba* significa paloma y su nombre deriva del latín e igualmente *livia* procede del latín como gris azulado. En el territorio nacional se encuentra principalmente en zonas urbanas, conocida como paloma de la plaza, hoy en día convive con el hombre y sus actividades diarias, por su adaptación y las dinámicas que hace del hombre, a través del cambio en su comportamiento silvestre, especialmente el hábito alimenticio, por consumo de maíz, pan, residuos de alimento entre otros, por el fácil acceso en su interacción con las personas. Por ello, la especie actualmente se encuentra dentro de las poblaciones sinantrópicas (Batiste 2010).

Características morfológicas de Columba livia

Toro (2000) menciona que la paloma (*Columba Livia* doméstica) tiene su origen en la paloma bravía (*Columba Livia*), endémica de Eurasia y África; fue introducida en el continente americano como ave doméstica en el siglo XVI, fue manipulada genéticamente por el hombre reconociéndose hoy alrededor de 200 razas (Toro 2000). Después de muchos años, la paloma se reincorporó a la vida silvestre acostumbrándose a la presencia de las personas; sobre poblando espacios en los cuales no existía un controlador biológico, aprovechando sus condiciones de adaptabilidad. La sobrepoblación animal se entiende como la cantidad excesiva de animales, que sobrepasa la cantidad de gente que está dispuesta a darles cuidados.

A través de la historia la paloma doméstica (*Columba livia*) ha sido considerada como un símbolo de entendimiento y paz entre las personas y se soslaya su papel como transmisora de patógenos de numerosas enfermedades zoonóticas, que en algunos casos conducen incluso a la muerte, González *et al.* (González 2007)

Las palomas como animales sinantrópicos, en los últimos años se han incrementado debido a su capacidad de adaptación tanto al habitar urbano y a nuevos nichos ecológica, llevando a la contaminación de gran cantidad de heces que se acumulan en varias zonas como plazas, edificios y monumentos visitados por personas. La presencia de estas palomas es principalmente porque realizan actividades como la elaboración de nidos en estructuras como edificios y casas y la obtención de alimentos. Las heces de palomas son un riesgo para la salud animal y el hombre, y son fuente de infecciones por microorganismos (virales, bacterianas y fúngicas), así mismo proveen del sustrato ideal para el desarrollo de ectoparásitos (Tarsitano *et al.* 2010) citado por Méndez *et al.* 2013.

Columba livia, paloma doméstica dentro de orden Columbiforme, con un promedio en tamaño entre 30,5 y 35,5 cm, cola de tamaño mediado y termina con una punta de color negro y la base de color blanco cremoso, con patas rojo intenso a claras y ojos que cambian de oscuros a ámbar cuando son adultos. En cuanto al color del plumaje varía entre la población de esta especie y por ello no hay un marcado dimorfismo sexual entre hembras y machos, aunque la base que prevalece es gris y se encuentran dos bandas gruesas de color negro en las alas, otra banda negra en la parte final de la cola, la rabadilla blanca y una franja brillante verde o morada en el cuello (Figura 2). Aunque estos colores son caracterizan a estas palomas, otros colores que van de blanco a blanquecino con franjas rojas y negras irregulares en las plumas primarias se presentan con cola de color blanca. Estas tienen un peso de 180 a 355 g (Nichols 2004).

Esta especie es de hábitos diurnos, encontrada en hábitats naturales, anidando en alcantarillados principalmente costeros o zonas altas. En las áreas urbanas se han ido agrupando por bandadas llegando a contar decenas de estas, volando, moviéndose y posándose en grupo, construyendo sus nidos con ramas y pasto en techos, conductos de drenaje entre otros, sobre una base sencilla, protegiendo los nidos y a la hembra el macho, para proteger a las crías (Villalba *et al.*, 2015).

Figura 2. Características de *Columba livia*



Paloma *Columba livia* cuya característica morfológica más sobresaliente es su pecho robusto, cabeza pequeña y el pico corto. Tomada de: <https://misanimales.com/biologia-y-distribucion-de-la-paloma-domestica/>

Cryptosporidium spp. y otros microorganismos presentes en palomas

En la investigación realizada por Apelbee *et al.* del año 2005, se realizó una revisión de las especies de *Cryptosporidium* spp y *Giardia* spp en animales mamíferos terrestres y marinos, aves, reptiles y peces. En este trabajo, se reconoce la contaminación por heces como una de las principales vías de transmisión del parásito. Se mencionan animales de vida libre o silvestre como principales reservorios del parásito como foco potencial de transmisión hacia animales domésticos y al humano, ya que en ocasiones estos animales pueden contaminar fuentes hídricas que son utilizadas por otras especies o por el contacto que pueden tener animales domésticos con animales silvestres infectados. Aunque los animales silvestres son reservorio importante de *Cryptosporidium*, no representan un problema en términos de salud pública, ya que las personas por lo general adquieren el parásito de animales domesticados como el ganado bovino, el cual es reservorio de *C. hominis* y *C. parvum*. Además, mencionan que las infecciones con *C. canis*, *Cryptosporidium meleagridis* (que afecta a aves) y *Cryptosporidium felis*, aunque no son comunes, pueden infectar al ser humano, especialmente a pacientes inmunocomprometidos.

En el artículo publicado por González *et al.* (González 2007) en el 2007, se mencionan los principales agentes aislados en muestras de sangre, contenido intestinal y de órganos de 100 palomas captadas en Chillán, Chile. Se determinó que, de las 100 palomas, 96 tenían *Salmonella* spp, 89 presentaban *Chlamydochloa psittaci* y 92 *Staphylococcus aureus*. Aunque esta investigación no habla de la determinación de *Cryptosporidium*, permite

tener una aproximación de la importancia de la identificación de agentes patógenos para el hombre en diferentes muestras provenientes de estas palomas, cómo es el caso de las heces.

En el año 2007, Mercado *et al.*, establecen que el parásito *Cryptosporidium* spp, no solo provoca manifestaciones clínicas gastrointestinales, sino cuando los ooquistes del protozoario son inhalados, puede causar afecciones respiratorias. Por otra parte, los autores describen la criptosporidiosis como una enfermedad causante de diarrea en personas inmunocompetentes; es el caso de pacientes que son VIH positivos sin tratamiento, en los cuales esta infección podría llegar a ser mortal. Los investigadores hallaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp por medio de la tinción de Ziehl Neelsen (ZN) en una muestra de esputo de un paciente con SIDA que presentaba síntomas respiratorios como tos persistente. Además, realizaron PCR identificando la especie del protozoario causante de la enfermedad cómo *C. hominis*. Los autores resaltan que para la época había poca información de la enfermedad pulmonar causada por este parásito y que lo demostrado mediante este hallazgo es que *Cryptosporidium* tiene la capacidad de adaptarse a diferentes entornos fisiológicos, como los tejidos del tracto intestinal y respiratorio.

Tzipori *et al.* consideró la criptosporidiosis como una infección poco frecuente, producida en los intestinos de los vertebrados. Por ello solo hasta 1980 se relacionó con enfermedades gastrointestinales en animales y en humanos. En los siguientes 25 años, se iniciaron estudios que generaron información sobre su biología, taxonomía, epidemiología y se desarrollaron métodos moleculares y primeros cultivos de estos. Por lo tanto, se reconoció la criptosporidiosis como enfermedad, como enfermedad en el año 1980: como infección oportunista crónica en pacientes con SIDA; impacto en la industria por la contaminación del agua por este protozoario y la importancia del estudio de la genómica del *Cryptosporidium*.

Por otro lado, el artículo de revisión realizado por la asociación del Centro Nacional de Enfermedades Zoonóticas, Transmitidas por Vectores y Entéricas con el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades realizó en Estados Unidos (Xiao 2009) describe *Cryptosporidium* epidemiológica, genética, ambiental y patológicamente⁰. Desde la revisión epidemiológica, se hace un sondeo de cuáles han sido las especies animales afectadas por este protozoo junto con la identificación de la especie de *Cryptosporidium* implicada. A nivel genético, se describen los distintos subtipos de *Cryptosporidium* encontrados en animales a nivel mundial y cuáles componentes, ácido ribonucleico mensajero (ARNm), ADN, proteínas específicas, han sido utilizados para encontrar las

diferencias entre cada especie hallada. A nivel ambiental, se describe la transmisión vectorial, contaminación del agua en pozos y plantas de tratamiento y la viabilidad de los ooquistes en estos ambientes. A nivel de Patología, se habla de cómo *Cryptosporidium* logra invadir el epitelio intestinal y el comportamiento del organismo a nivel inmunológico y bioquímico.

Igualmente, en Islas Canarias, España, Abreu *et al.* elaboraron un estudio en apoyo con el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias. El objetivo principal de este estudio fue la detección de *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis* en palomas, específicamente de la especie *Columba livia*, ya que es la especie de mayor prevalencia en zonas urbanas cerradas, parques de recreación y plazas, las cuales son áreas en donde se aglomeran gran cantidad de personas, haciendo hincapié en que los niños son los individuos con mayores factores predisponentes para el padecimiento de criptosporidiosis. Para el desarrollo de este estudio, se optó por capturar un número de aves específico. Posterior a su captura, se procedió a realizar su sacrificio y disección para obtener muestras directamente de su tracto gastrointestinal. A estas muestras, se les realizó tinciones de Zielh Neelsen para encontrar estructuras parasitarias relacionadas con coccidios. Posteriormente, se extrajo y purificó su material genético, al cual se procedió a realizar la amplificación de material genético, para saber qué microorganismos están presentes en dichas muestras. Este material genético seleccionado, fue comparado con bases de datos para dar como resultado las 2 principales especies de *Cryptosporidium* citadas. En este trabajo se concluye que el control de las palomas de la especie *Columba livia* es un factor importante para evitar la proliferación de este parásito en otros animales, y reducir los casos de criptosporidiosis presentes en las Islas Canarias.

Así mismo es necesario tener en cuenta, factores predisponentes para adquirir criptosporidiosis en nichos con deficiente saneamiento ambiental, al igual que contaminación de agua potable y la cercanía en la interrelación de humanos y animales. Esta enfermedad es transmitida y diseminada a través de vía oral con la ingestión de alimentos y agua contaminados, principalmente donde existe mayor interacción entre humano y animales, por lo cual se hace necesario una vigilancia de alimentos de alimentos, agua y control de depósitos fecales (Chukwuma 2019).

Chapell *et al.*, en el año 2011 establecieron la incidencia de *C. meleagridis*. Se analizaron 10 individuos sanos entre 18 a 50 años para realizar dicho estudio. En primer lugar, los individuos sanos se sometieron a una dosis de *C. meleagridis* concentrada. Los investigadores observaron los síntomas que desarrollan los individuos, destacando la

presencia de flatulencias en los primeros días de la infección. Sin embargo, solo un individuo desarrolló diarrea durante el estudio. La presencia masiva de ooquistes presentes en heces sucedió en el 5 día post infección. Para el día 9 al 11, no se detectó la presencia de ooquistes en heces. Al realizar la técnica de PCR, se detectó el 100% del material genético, compatible con *C. meleagridis*. Concluyeron, que las infecciones por *C. meleagridis* en su mayoría son auto limitantes, pero, la importancia de esta enfermedad es en pacientes inmunosuprimidos, quienes pueden resultar muy afectados.

En enero de 2013, Bouzid *et al.*, hicieron una revisión donde aportan una descripción de las características de *Cryptosporidium* spp, al momento de producir enfermedad y la reacción del huésped frente a este patógeno, partiendo de la definición de virulencia, como la capacidad de que un elemento microbiano genere enfermedad. Describen, además, patogénesis, síntomas y las implicaciones que tiene en pacientes inmunosuprimidos, como se ha mencionado en artículos anteriores, describiendo el ciclo de vida de este parásito. Una vez más se destaca el uso del método de Ziehl Neelsen modificado para la identificación de este parásito junto con técnicas de flotación a partir de heces infectadas, el uso de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) e inmunofluorescentes (O auramina), uso de paneles de diagnóstico con PCR, que además de identificar *Cryptosporidium* spp, puede identificar otros coccidios patógenos para el ser humano. A partir de técnicas de amplificación y secuenciación de material genético, se ha logrado identificar los distintos factores de virulencia que posee *Cryptosporidium*, como el CSL y el gp900 para la adhesión; Cp2 y Cpa135 para la invasión; Serin-proteasa y Aminopeptidasa en la desenquistación, entre otros.

En el artículo del año 2013 Méndez *et al.* (Mendez 2013), presenta una revisión literaria donde determinaron aquellos microorganismos que producen enfermedades por y se desarrollan por contacto directo con aves (palomas) como *Cryptococcus neoformans*, *Chlamydomydia psittaci* y *Cryptosporidium* spp. Este último, ha sido aislado en excreciones de heces frescas o en heces secas que se acumulan en aleros de edificios y en general en estructuras de viviendas, que son los sitios de mayor preferencia de las palomas, por su cercanía al hombre que lo puede suplir de alimento. El medio que provee las heces secas, son alcalinas, ricas en sales y nitrógeno se encuentra frecuente en ambientes de área urbana, las cuales pueden generar contaminación ambiental, pudiendo generar en altas concentraciones un peligro para la salud de los demás animales incluyendo el hombre quien frecuentemente tiene contacto directo con las palomas, tanto en el área urbana como rural.

En el trabajo elaborado por Pérez 2013, se describe la distribución de casos y la prevalencia de especies a lo largo del continente americano de *Cryptosporidium* spp. Este documento se realizó a partir de registros bibliográficos desde el 2002 hasta el 2013. En primer lugar, se habla de la prevalencia de casos de criptosporidiosis, liderando Norteamérica con el 42.6% confirmados, seguido de Centroamérica con 36.23%, el Caribe con 23.9% y finalmente Suramérica con 23.9%. En Estados Unidos, según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) se ha reportado un número variable de casos en el registro bibliográfico de 9 años, el cual estipula que el aumento de casos de criptosporidiosis se ve relacionado con la temporada de verano, ya que aumentan las actividades acuáticas recreacionales. Esto se relaciona con el hecho de que *Cryptosporidium* spp es altamente resistente al cloro del cual disponen los centros de tratamiento de agua potable y piscinas. En Centroamérica, la prevalencia se ve reflejada por el consumo de agua contaminada con ooquistes o consumo de alimentos contaminados. En Sudamérica, principalmente Colombia es el segundo país con mayor número de casos de criptosporidiosis, en donde la población afectada son niños inmunocompetentes o inmunosuprimidos (VIH +) y personas con procesos tumorales malignos. Al momento de realizar el diagnóstico de criptosporidiosis, Norteamérica es líder en los métodos más actualizados para la detección de este parásito, con el uso de PCR y ensayos inmunoenzimáticos. Suramérica y el Caribe, usan como técnica “gold standar” la detección de ooquistes por Ziehl Neelsen modificado, seguido por PCR. Centroamérica no utiliza biología molecular. Las especies asociadas a infección en humanos son *C. parvum* desde Norteamérica hasta Colombia y *C. hominis* desde Perú hasta el sur del continente. Se ha encontrado que *Cryptosporidium* spp está presente en la mayoría de los mamíferos, bovinos, porcinos, felinos, caninos, entre otros.

En el año 2014, Koompapong, *et al.* realizaron la recolección de muestras de palomas domésticas *Columba livia*, gaviotas de cabeza marrón (*Chroicocephalus brunnicephalus*) y gaviotas de cabeza negra (*Chroicocephalus ridibundus*), gatos y perros callejeros y muestras de perros de una granja. En estas muestras se logró aislar el ADN de *Cryptosporidium* spp con el fin de identificar el parásito en las muestras que fueron tomadas para el estudio. Con el uso de la técnica de PCR, se identificaron las secuencias de *Cryptosporidium meleagridis* y *Cryptosporidium aviar* genotipo en las muestras de palomas y gaviotas, recalando que estos animales son de vida libre y se encuentran generalmente en las costas y muelles cerca a los humanos, siendo un factor contaminante de las

fuentes hídricas que están en estas zonas, generando un potencial alto de riesgo zoonótico.

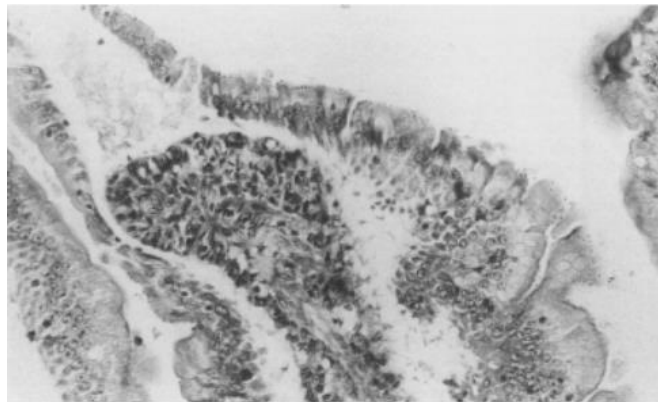
Para conocer otras especies de *Cryptosporidium* spp. que afectan a distintas especies animales, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), estableció en el capítulo Criptosporidiosis otros aspectos para conocer las especies de *Cryptosporidium* que presentan tropismo por otro tipo de animales. Hay por lo menos 32 especies de *Cryptosporidium* confirmadas, las cuales presentan diferentes tropismos entre las distintas especies de este protozoo. Por ello las técnicas de diagnóstico deben permitir la diferenciación, usando técnicas como la Inmunofluorescencia directa, inmunocromatografía, ensayos inmunoenzimáticos y técnicas moleculares como PCR.

Presentación y epidemiología de Cryptosporidium spp en Columba livia

Este protozoario se ha encontrado afectando el tracto digestivo y respiratorio de aves, reportando más de 30 especies, que son hospedoras de varios ordenes como las *Passeriformes*, *Psittaciformes*, *Columbriformes*, *Galliniformes*, *Anseriformes* y *Struthioniformes* y se encuentran distribuidas en África, Europa, América del Sur y del Norte, Asia y Oceanía (Nakamura 2015).

Esta sensación intestinal se describe por primera vez en Islas Canarias, de una granja de palomas (*Columba livia*) con 80 jóvenes y 200 adultos, con una morbilidad del 40% y mortalidad del 5% en la granja, donde la principal característica fue la presencia de diarrea y disminución del peso corporal en tres pichones de cuatro semanas de edad. Enfermedad que se asoció con una hiperplasia de criptas intestinales (Figura 3) y moderada infiltración inflamatoria (Toro 2000).

Figura 3. Criptas intestinales con desarrollo de *Cryptosporidium* spp



Infiltración inflamatoria en criptas intestinales y desarrollo de *Cryptosporidium* spp. Hematoxilina y eosina. 275x.(Murphy 2015)

La capacidad de *Cryptosporidium* de infectar varios animales y la sobrevivencia de sus ooquistes en el medio ambiente, permite la transmisión entre estos incluyendo la especie humana. Por lo tanto, en la epidemiología de la criptosporidiosis, las rutas de transmisión no son hasta el momento totalmente claras, porque los diagnósticos tradicionales no son capaces de diferenciar características específicas de dichos parásitos y por el elevado costo de los estudios epidemiológicos. Sin embargo, en los últimos años se han realizado técnicas moleculares para identificar y diferenciar especie/genotipo y subtipo de *Cryptosporidium*, para estudios epidemiológicos, principalmente en áreas epidémicas y endémicas, conllevando a comprender mejor la transmisión de Criptosporidiosis en animales y humanos. Este método ha sido de gran utilidad recientemente para el estudio epidemiológico molecular de esta enfermedad. Una revisión reciente examinó la epidemiología de la criptosporidiosis en países de ingresos bajos y medios. En ese estudio, se examinó una gama mucho más amplia de países, incluidos Asia, África y América del Sur, además de algunos países de Oriente Medio (Xiao 2010).

Criptosporidiosis y “Una sola Salud”

Este género de microorganismo hallado principalmente en personas con inmunodeficiencia adquirida, y su prevalencia relacionada igualmente, con las características socioeconómicas de los habitantes de una población determinada, encontrándolos frecuentemente en lugares donde hay una mala infraestructura donde se canaliza el agua potable, en piscinas, en el descarte de aguas residuales o a través de contacto directo con animales. Para ello, al no ser eficaz los tratamientos se recomienda remediación de piscinas posterior a eventos de incidentes fecales (Murphy 2015).

Esta enfermedad a pesar de haberse encontrado hace décadas, carece de una fortaleza el área académica, social, cultural y política, que debe ser comprendida por un equipo interdisciplinar de profesionales principalmente en el área de Medicina humana, Medicina Veterinaria y área Agroambiental entre otras disciplinas. Esto para crear estrategias conjuntas que generen una vigilancia en Salud pública, prevención y control que trascienda en “Una sola Salud”.

Referencias

- Abreu-Acosta N, Foronda-Rodríguez P, López M, Valladares B. (2009). Occurrence of *Cryptosporidium hominis* in pigeons (*Columba livia*). *Versita*.
- Appelbee AJ, Thompson RCA, Olson ME. (2005). *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife - Current status and future needs. *Trends Parasitol*, 21(8), 370–6.
- Araujo AV, Gómez Muñoz M de los Á, Milano AMF. (2011). Prevalencia de la infección por *Cryptosporidium* spp. en bovinos de dos establecimientos del Nordeste Argentino. *REDVET-Rev electron vet*, 12(10), 1–10.
- Batiste MP, Castaño N, Cárdenas López D, Gutiérrez F de P, Gil DL, Lasso CA, et al. (2010). Análisis de riesgo y propuesta de categorización de especies introducidas para Colombia [Internet]. 202 p. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/13038>
- Bouzig M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. (2013). *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. *Clin Microbiol Rev*, 26(1), 134.
- Cama VA, Bern C, Roberts J, Cabrera L, Sterling CR, Ortega Y, et al. (2008). *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerg Infect Dis*, 14(10), 1567–74.
- Carreno RA, Schnitzler BE, Jeffries AC, Tenter AM, Johnson AM, Barta JR. (1998). Phylogenetic analysis of coccidia based on 18S rDNA sequence comparison indicates that *Isospora* is most closely related to *Toxoplasma* and *Neospora*. *J Eukaryot Microbiol*, 45(2), 184–8.
- Chappell CL, Okhuysen PC, Langer-Curry RC, Akiyoshi DE, Widmer G, Tzipori S. (2011). *Cryptosporidium meleagridis*: infectivity in healthy adult volunteers. *Am J Trop Med Hyg*, 85(2), 238–42.
- Chukwuma C. (2019). *Cryptosporidium*: Public Health Problems and Environmental Indicators. *Austin Med Sci*, 4(2), 1036.
- Cook RA, Karesh WB. (2012). Emerging Diseases at the Interface of People, Domestic Animals, and Wildlife. En: *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine: Current Therapy*. W.B. Saunders, 136–46.

- Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL. (2002). Cryptosporidiosis: Epidemiology and impact. *Microbes Infect*, 4(10), 1059–66.
- F. V. REVISTA DE CIENCIAS VETERINARIAS. (2017). Plagas Urbanas: Las palomas y su impacto sobre el ambiente y la salud pública Cetosis [Internet]. 17. Disponible en: <https://www.urp.edu.pe/pdf/id/2615/n/revista-cv.-felipe.-n-1.2017-1.pdf>
- Gómez de S, Oliveras DI, Medellín RA. (2005). Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Ciudad de Mexico.
- González-Acuña D, Silva G. F, Moreno S. L, Cerda L. F, Donoso E. S, Cabello C. J, et al. (2007). Detección de algunos agentes zoonóticos en la paloma doméstica (*Columba livia*) en la ciudad de Chillán, Chile. *Rev Chil infectología*, 24(3), 199–203.
- Helmy YA. (2014). Epidemiological investigations on the public health significance of *Cryptosporidium* parasites in livestock and people in the Ismailia Canal Zone of Egypt. [Tesis doctoral, Freien Universität Berlin].
- Instituto de protección y bienestar animal. (2019). DISTRITO ALAS MANEJO POBLACIONAL DE PALOMAS DE PLAZA (*Columba livia domestica*) EN EL DISTRITO CAPITAL. Bogotá.
- Khurana S, Chaudhary P. (2018). Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Trop Parasitol*, 8(1), 7.
- Koompapong K, Mori H, Thammasonthijarern N, Prasertbun R, Pintong AR, Popruk S, et al. (2014). Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in seagulls, pigeons, dogs, and cats in Thailand. *Parasite*, 21, 21–52.
- Kumurya AS, Gwarzo MY. (2013). Cryptosporidiosis in HIV infected patients with diarrhoea in Kano state, North-western Nigeria. *J AIDS HIV Res*, 5(8), 301–5.
- Leander BS, Clopton RE, Keeling PJ. (2003). Phylogeny of grenarines (Apicomplexa) as inferred from a small-subunit rDNA and β -tubulin. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53(1), 345–54.
- Lendner M, Dauschies A. (2014). *Cryptosporidium* infections: molecular advances. *Parasitology*, 141(11), 1511–32.
- Matos O, Alves M, Xiao L, Cama V, Antunes F. (2004). *Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in Persons with HIV, Portugal. *Emerg Infect Dis*, 10(12), 2256.
- Méndez V, Villamil L, Buitrago D, Soler-Tovar D. (2013). La paloma (*Columba livia*) en la transmisión de enfermedades de importancia en salud pública. *Rev Cienc Anim*, 1(6), 177–94.

- Mercado R, Buck GA, Manque PA, Ozaki LS. (2007). *Cryptosporidium hominis* Infection of the Human Respiratory Tract. *Emerg Infect Dis*, 13(3), 462–4.
- Monsalve S, Mattar S, González M. (2009). Zoonosis transmitidas por animales silvestres y su impacto en las enfermedades emergentes y reemergentes. *RevMVZ Córdoba*, 14(2), 1762–73.
- Morgan UM, Thompson RCA. (1998). PCR detection of cryptosporidium: the way forward? *Parasitol Today*, 14(6), 241–5.
- Murphy JL, Arrowood MJ, Lu X, Hlavsa MC, Beach MJ, Hill VR. (2015). Effect of Cyanuric Acid on the Inactivation of *Cryptosporidium parvum* under Hyperchlorination Conditions. *Environ Sci Technol*, 49(12), 7348–55.
- Nakamura AA, Meireles MV. (2015). *Cryptosporidium* infections in birds - A review. *Rev Bras Parasitol Vet*, 24(3), 253–67.
- Nichols RAB, Smith HV. (2004). Optimization of DNA extraction and molecular detection of *Cryptosporidium* oocysts in natural mineral water sources. *J Food Prot*, 67(3), 524–32.
- Nina JMS, McDonald V, Deer RMA, Wright SE, Dyson DA, Chiodini PL, et al. (1992). Comparative study of the antigenic composition of oocyst isolates of *Cryptosporidium parvum* from different hosts. *Parasite Immunol*, 14(2), 227–32.
- Omoruyi BE, Nwodo UU, Udem CS, Okonkwo FO. (2014). Comparative Diagnostic Techniques for *Cryptosporidium* Infection. *Mol*, 19(2), 2674–83.
- Pace NR. (2009). Mapping the Tree of Life: Progress and Prospects, 73(4), 565–76.
- Pereira CRA, Ferreira AP, Koifman RJ, Koifman S. (2011). Prevalence of *cryptosporidium* spp. in domestic companion animals of elderly population in Teresópolis, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Bras Geriatr Gerontol*, 14(1), 17–25.
- Pérez JS. (2013). Estado actual de la zoonosis por *Cryptosporidium* spp. en el continente americano. [Tesis doctoral, Pontificia universidad Javeriana].
- Ramirez NE, Ward LA, Sreevatsan S. (2004). A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes Infect*, 6(8), 773–85.
- Ryan U, Papparini A, Monis P, Hijjawi N. (2016). It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Research*, 105, 305–13.
- Silverlås C, Mattsson JG, Insulander M, Lebbad M. (2012). Zoonotic transmission of *Cryptosporidium meleagridis* on an organic Swedish farm. *Int J Parasitol*, 42(11), 963–7.

- Tandel J, English ED, Sateriale A, Gullicksrud JA, Beiting DP, Sullivan MC, et al. (2019). Life cycle progression and sexual development of the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*. *Nat Microbiol*, 4(12), 2226–36.
- Tandon N, Gupta S. (2014). Cryptosporidiosis causing severe persistent diarrhea in a patient with multiple myeloma: A Case report and brief review of literature. *Indian J Med Paediatr Oncol*, 35(1), 93–5.
- Toro H. (2000). Palomas: Historia, presencia en Chile y riesgos asociados. *TecnoVet*, 6(2).
- Tzipori S, Widmer G. (2008). A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis *Cryptosporidium* – a harmless and incidental agent. *Trends Parasitol*, 24(4), 184–9.
- Uribe E, Silva S. (2020). PRESENCIA DE ENDOPARÁSITOS Y ECTOPARÁSITOS CON POTENCIAL ZOONÓTICO EN PALOMAS (*Columba livia*) DE LA PLAZA DE BOLÍVAR DE LA CIUDAD DE BOGOTÁ, COLOMBIA. [Tesis de maestría, Universidad Antonio Nariño].
- Usluca S, Aksoy Ü. (2011). Detection and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic stools by PCR/RFLP analyses. *J Med Sci*, 41(6), 1029–36.
- Van Zeeland YRA, Schoemaker NJ, Kik MJL, Van Der Giessen JWB. (2008). Upper respiratory tract infection caused by *Cryptosporidium baileyi* in three mixed-bred falcons (*Falco rusticolus* x *Falco cherrug*). *Avian Dis*, 52(2), 357–63.
- Villalba Sánchez C, De La Ossa Lacayo A, De La Ossa V J. (2015). Density of domestic pigeons (*Columba livia domestica* Gmelin, 1789) in the new public market of Sincelejo, Sucre, Colombia. *Rev UDCA Actual Divulg Científica*, 18(2), 497–502.
- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. (2004). *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clin Microbiol Rev*, 17(1), 72–97.
- Xiao L. (2009). Overview of *Cryptosporidium* Presentations at the 10th International Workshops on Opportunistic Protists. *Eukaryot Cell*, 8(4), 429–36.
- Xiao L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp Parasitol*, 124(1), 80–9.

Explorando la diabetes inducida en *Caenorhabditis elegans* y el impacto de un extracto hipoglucemiante³⁹

Alejandra Mantilla Galindo⁴⁰
Martha Gómez Jiménez⁴¹
Ruth Mélida Sánchez Mora⁴²

Resumen

La diabetes, una enfermedad degenerativa relacionada con altas concentraciones de glucosa en el organismo, representa un importante problema de salud pública que causa mortalidad. Aunque el tratamiento generalmente se enfoca en controlar la enfermedad, a menudo se pasan por alto los efectos negativos que tiene en la reproducción de las personas afectadas. Con el fin de abordar esta problemática, se llevó a cabo un estudio piloto realizado por el Semillero y el grupo de Investigación en Biotecnología y Genética de la UCMC. **Objetivo:** evaluar el efecto del extracto hipoglucemiante de una planta de la familia *Rubiaceae* sp. en la agregación de grasas, motilidad y reproducción de la cepa N2 de *Caenorhabditis elegans* como modelo de diabetes inducida. **Metodología:** Los nematodos fueron cultivados en medio NGM con la cepa de *E. coli* OP50 como alimento. Inicialmente, se llevó a cabo la sincronización y caracterización fenotípica del modelo de diabetes inducida en el nematodo, utilizando la técnica de

³⁹ Concentraciones altas de Glucosa afectan la reproducción y motilidad de la cepa N2 de *Caenorhabditis elegans*. Grupo Biotecnología y Genética UCMC.

⁴⁰ MSc en inmunología Universidad de Cartagena. Docente parasitología UCMC. Correo electrónico: amantilla@unicolmayor.edu.co.

⁴¹ Msc Microbiología. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Docente. Correo electrónico: mgomez@unicolamayor.edu.co

⁴² PhD en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Docente y líder grupo Biotecnología y Genética UCMC. Correo electrónico: rmsanchezm@unicolamayor.edu.co

tinción con Negro Sudan B. Posteriormente, se realizaron ensayos de reproducción y motilidad utilizando los métodos estandarizados por el grupo. Las determinaciones se realizaron tanto con el tratamiento con el extracto hipoglucemiante como sin él. **Resultados:** El análisis fenotípico de Icpa silvestre N2 expuesta a glucosa reveló agregados de grasas, confirmados con la tinción con Negro Sudan B. Sin embargo, el tratamiento hipoglucemiante mostró una mejora significativa en la reproducción y la motilidad de los nematodos modelo de diabetes inducida, permitiendo sugerir el modelo de *C. elegans* como herramienta útil en la formación en investigación.

Palabras claves: *Caenorhabditis elegans*, diabetes inducida, hipoglucemiante.

INTRODUCCIÓN

Los niveles de glucosa en la dieta son importantes para una gran variedad de organismos vivos, ya que son necesarios para la reproducción y el aprovechamiento de energía, con el fin de cumplir con las exigencias básicas del funcionamiento celular. Sin embargo, un suministro elevado de glucosa se convierte en un factor de riesgo para el desarrollo y mantenimiento de trastornos metabólicos como la diabetes (Barquilla, 2019; Yu & Muehleman, 2023). Además, está estrechamente relacionado con la producción excesiva de radicales libres de oxígeno (EROs), los cuales generan desequilibrios en el proceso de oxidación y reducción (rédox), daño celular directo y afectan el proceso de envejecimiento, así como el inicio y desarrollo de enfermedades de alta morbilidad y mortalidad, como aterosclerosis, cáncer, enfermedades del sistema nervioso central, enfermedades autoinmunes y daño por isquemia-reperfusión, entre otras (Cervantes-Villagrana, Presno-Bernal, 2013 ; Lee *et al.*, 2009)

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), “*la Diabetes Mellitus (DM) es una grave enfermedad crónica que se desencadena cuando el páncreas no produce suficiente insulina (hormona que regula el nivel de azúcar, o glucosa, en la sangre), o cuando el organismo no puede utilizar con eficacia la insulina que produce. La diabetes es un importante problema de salud pública y una de las cuatro enfermedades no transmisibles (ENT) seleccionadas por los dirigentes mundiales para intervenir con carácter prioritario. En las últimas décadas han aumentado sin pausa el número de casos y la prevalencia de la enfermedad*” (OMS, 2016).

Esta enfermedad afecta a una gran cantidad de personas a nivel mundial y está en aumento. Según la OMS, Se estima que 62 millones de personas en las Américas viven

con DM tipo2. Este número se ha triplicado en la Región desde 1980 y se estima que alcanzará la marca de 109 millones para el 2040 (OPS/OMS, 2024).

Aunque existen factores genéticos que influyen en el desarrollo de la diabetes, otros elementos determinantes incluyen el estilo de vida, el tipo de alimentos que se consumen diariamente y el sedentarismo, entre otros (Laakso & Fernandes Silva, 2022). Comprender el origen y la evolución de esta enfermedad es fundamental para lograr avances significativos en la búsqueda de una cura, razón por la cual se utilizan con fines experimentales modelos *in vivo*. Uno de estos modelos es el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), debido a su alta homología genética con los mamíferos.

Gracias a este modelo, se ha logrado estudiar enfermedades como el Parkinson, el Alzheimer y la DM, entre otras (Cooper & Van Raamsdonk, 2018; Hernández-Cruz *et al.*, 2023). Estas enfermedades, que diariamente afectan a nuevas personas en todo el mundo, tienen un impacto significativo en la esperanza de vida y en otros aspectos de la población.

C. elegans es un nematodo de vida libre que pertenece a la familia *Rhabditidae*. Tiene aproximadamente 1 mm de longitud en el estado adulto, y una estructura bilateral simétrica, con cuatro cordones epidérmicos y una cavidad que contiene una serie de fluidos que le confieren un aspecto transparente cuando se observa a contraluz (WormBase, 2014). Por lo general, *C. elegans* es un organismo hermafrodita, aunque en condiciones naturales se produce un pequeño porcentaje de especímenes masculinos (menos del 0.05% del total) (Corsi *et al.*, 2015).

Sin embargo, después de la manipulación *in vitro* del cruce con machos, la proporción de descendencia cambia, siendo del 50% tanto para hermafroditas como para machos (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). *C. elegans* tiene 6 pares de cromosomas, con aproximadamente 97 millones de pares de bases nitrogenadas y más de 19,000 genes (WormBase, 2014).

C. elegans se utiliza como modelo en diversos estudios genéticos, especialmente en genética del desarrollo y neurobiología, debido a sus condiciones favorables. Presenta transparencia a lo largo de su vida, lo que facilita la observación del desarrollo temprano bajo el microscopio. Además, al ser hermafrodita, permite obtener y mantener individuos con mutaciones recesivas. Con alrededor de 1000 células, su estructura celular es relativamente simple, lo que ha permitido investigar la generación de cada linaje celular durante el desarrollo. Los nematodos *C. elegans* también muestra una alta homología con los genes humanos (aproximadamente un 40% de homología), lo que

lo convierte en un organismo atractivo para el estudio de enfermedades humanas. Por último, su fácil cultivo, corto período de vida y ciclo reproductivo rápido lo hacen un modelo de mantenimiento sencillo en el laboratorio (Corsi *et al.*, 2015).

Al igual que otros nematodos, presenta un cuerpo cilíndrico plano no segmentado y cónico en sus extremos. Está constituido por un tubo exterior y un tubo interior, separados entre sí por el espacio pseudocelómico (Altun & Hall, 2012). El tubo exterior, que conforma la pared del cuerpo, incluye la cutícula, la hipodermis, el sistema excretor, las neuronas y los músculos. Por otro lado, el tubo interior está compuesto por la faringe, el intestino y, en los adultos, las gónadas. Todos estos tejidos se encuentran bajo una presión hidrostática interna que es regulada por un sistema de osmorregulación (Lewis & J.T., 1995).

El nematodo presenta una cutícula de colágeno, secretada por el epitelio subyacente que recubre el cuerpo, así como las líneas de la faringe y el recto (Johnson *et al.*, 1984). Además, posee un sistema epitelial formado por una serie de anillos concéntricos de cinco células sincitiales, tres mononucleadas y una célula sincitial en la cola (Johnson *et al.*, 1984).

Las células del sistema nervioso (SN) están organizadas en los ganglios de la cabeza y la cola. La mayoría de las neuronas en *C. elegans* se encuentran alrededor de la faringe en la cabeza. En el cuerpo, las neuronas están dispuestas en línea media, adyacente a la hipodermis ventral. Por otro lado, el sistema muscular, las neuronas y la hipodermis están separados de la musculatura por una lámina basal fina. Los músculos estriados oblicuamente de la pared del cuerpo están dispuestos en tiras en cuatro cuadrantes, dos dorsales y dos ventrales, a lo largo de todo el animal (Johnson *et al.*, 1984). En cuanto al sistema excretor, consta de cuatro tipos de células: las del poro, las del conducto, las del canal y un par fusionado de células glandulares (Lewis & J.T., 1995).

El sistema digestivo, está formado por el intestino, un órgano grande que desempeña múltiples funciones, como la digestión de los alimentos, la absorción de nutrientes, la síntesis y el almacenamiento de macromoléculas, además de mediar la respuesta inmune innata frente a patógenos. El intestino está compuesto por 20 grandes células epiteliales que se disponen en su mayoría en pares bilateralmente simétricos para formar un tubo largo alrededor del lumen, cada par de células forma un anillo intestinal (Byerly *et al.*, 1976).

El sistema reproductivo está conformado por la gónada somática, la línea germinal y el aparato para la colocación de huevos, compuesto por: el útero, los músculos uterinos,

la vulva y un neuropilo local formado por neuronas (Bird & Bird, 2012). En el caso de las larvas de *C. elegans* macho, inicialmente presentan un cuerpo cilíndrico simple similar al de los hermafroditas, pero a partir del estadio L2 se producen cambios a medida que los órganos sexuales comienzan a desarrollarse. Los sistemas tisulares, excepto la faringe y el sistema excretor, presentan algún grado de dimorfismo. Las diferencias entre larvas hermafroditas y machos, más marcadas se observan en los tejidos de la parte posterior, que son responsables del aparato copulador masculino (Bird & Bird, 2012) (WormAtlas All Rights Reserved, 2024).

La ovulación involucra la coordinación de las células de la vaina gonadal, que son células especializadas similares al músculo liso que recubren los ovocitos. Durante la ovulación, las células proximales de la vaina gonadal, se contraen rápidamente, mientras que la espermateca distal se dilata y las células de la vaina jalan la espermateca distal sobre el ovocito maduro. El ovocito controla su propia ovulación de dos maneras: modulando las contracciones de la vaina gonadal, lo cual incluye un aumento en la velocidad y la intensidad de la ovulación, e induciendo la dilatación espermática durante la ovulación. Las mutaciones que afectan la ovulación pueden dar lugar a un fenotipo de ovocito endomitótico (Emo), en el cual los ovocitos retenidos en el brazo de la gónada experimentan múltiples rondas de ruptura de la envoltura nuclear, entrada en la fase M y fase S, y se vuelven altamente poliploides (Greenstein, 2005).

En cuanto al control de la fertilización, este proceso depende de una serie de interacciones en las que los espermatozoides y los ovocitos se reconocen, se unen y se fusionan. La activación del ovocito, el bloqueo de la polispermia y la activación del programa embrionario son dependientes de la fertilización. Singson y colaboradores (1998) lograron caracterizar y clonar el gen SPE-9, el cual desempeña un papel importante en los espermatozoides durante el proceso de fertilización. Las mutaciones en este gen no afectan la espermatogénesis y los espermatozoides tienen una morfología normal que no pueden fertilizar ovocitos incluso después del contacto entre gametos (Cortés & Espitia, 2018). El gen *spe-9* codifica una proteína transmembrana que contiene un dominio extracelular con 10 repeticiones de tipo factor de crecimiento epidérmico, su sigla en inglés (*EGF*). Por lo tanto, Singson y colaboradores (1998) propusieron que este gen puede funcionar como ligando para un receptor de ovocitos (Greenstein, 2005).

Homología del modelo de diabetes en *C. elegans*

EN los seres humanos, la insulina es producida en los Islotes de Langerhans ingresa al torrente sanguíneo y se une al extremo N-terminal de los receptores de insulina, los cuales se encuentran ubicados en el tejido muscular, adiposo y hepático (Cortés & Espitia, 2018). Una vez que la insulina interactúa con su receptor, una molécula de fosfato se une a la tirosina, iniciando la señalización. En el modelo invertebrado *C. elegans*, se ha identificado una vía homóloga a las vías de señalización de la insulina en humanos, conocida como la vía del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) (WormBook, 2014).

El receptor de insulina está compuesto por dos subunidades alfa y dos subunidades beta, las cuales son codificadas por un gen ubicado en el cromosoma 19. Las subunidades beta son transmembrana, mientras que las subunidades alfa se encuentran en la parte externa de la membrana. Las subunidades alfa están unidas entre sí por puentes disulfuro, y a su vez se unen a las subunidades beta mediante enlaces disulfuro (Cortés & Espitia, 2018).

En el interior de la célula, ocurre una transferencia de grupos fosfato provenientes del ATP gracias a la acción del receptor de insulina. Como resultado de esta actividad, se produce un aumento en el transporte de moléculas de glucosa, lo que genera una acumulación de glucosa dentro de las células musculares y adipocitos del nematodo.

El propósito de este estudio piloto consistió en analizar los impactos sobre la agregación de grasas, la motilidad y la reproducción en la cepa N2 de *C. elegans*, como modelo de diabetes inducido. Además, se buscó examinar el efecto del extracto hipoglucemiante proveniente de una planta perteneciente a la familia *Rubiaceae* sp. en este contexto. Este proyecto piloto busca fortalecer el modelo diabetes inducido en *C. elegans* en el Semillero y grupo de investigación de Biotecnología y Genética UCMC.

METODOLOGIA

Se realizó un estudio experimental en un modelo *in vitro* con el organismo *C. elegans*, cepa N2. Este estudio piloto, busca describir la inducción de un modelo de diabetes, y su efecto sobre la agregación de grasas, reproducción y motilidad, en un modelo de diabetes inducida, *in vivo* en *C. elegans*. Además, este diario de campo tiene como fin

compartir la experiencia de la implementación del modelo en el Semillero y Grupo de Investigación Biotecnología y Genética UCMC, en colaboración con estudiantes de pregrado del programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

La evaluación del efecto de la glucosa, así, como del extracto hipoglucemiante se realizaron por triplicado para todos los ensayos. Todos los ensayos fueron llevados a cabo utilizando las cepas N2 de *C. elegans*, donados por la Dra. Andrea Calixto, laboratorio de neurociencias Universidad de Valparaíso. Chile. Los cultivos de las cepas N2 de *C. elegans* se realizaron en el medio NGM (*Nematode Growth Medium*) con césped de la bacteria *Escherichia coli* OP50 como fuente de alimento. Para la preparación del medio se mezclaron 3 g de NaCl, 17 g de agar, 2,5 g de peptona en 975 mL de H₂O destilada. La mezcla se llevó a autoclave durante 50 min y, a continuación, se enfrió en baño de agua a 55 °C durante 15 min. El medio NGM fue enriquecido, en ese momento, con 1 mL de CaCl₂ 1M, 1 mL de colesterol (5 mg/mL etanol), 1 mL MgSO₄ 1M, 25 mL buffer KPO₄ 1M pH 6,0 (108,3 g KH₂PO₄, 35,6 g K₂HPO₄ en 1L de H₂O). Protocolo sugerido por Surco-Laos *et al.*, 2011. En la figura 1, se observa un diagrama que resume la metodología implementada en este diario de campo.

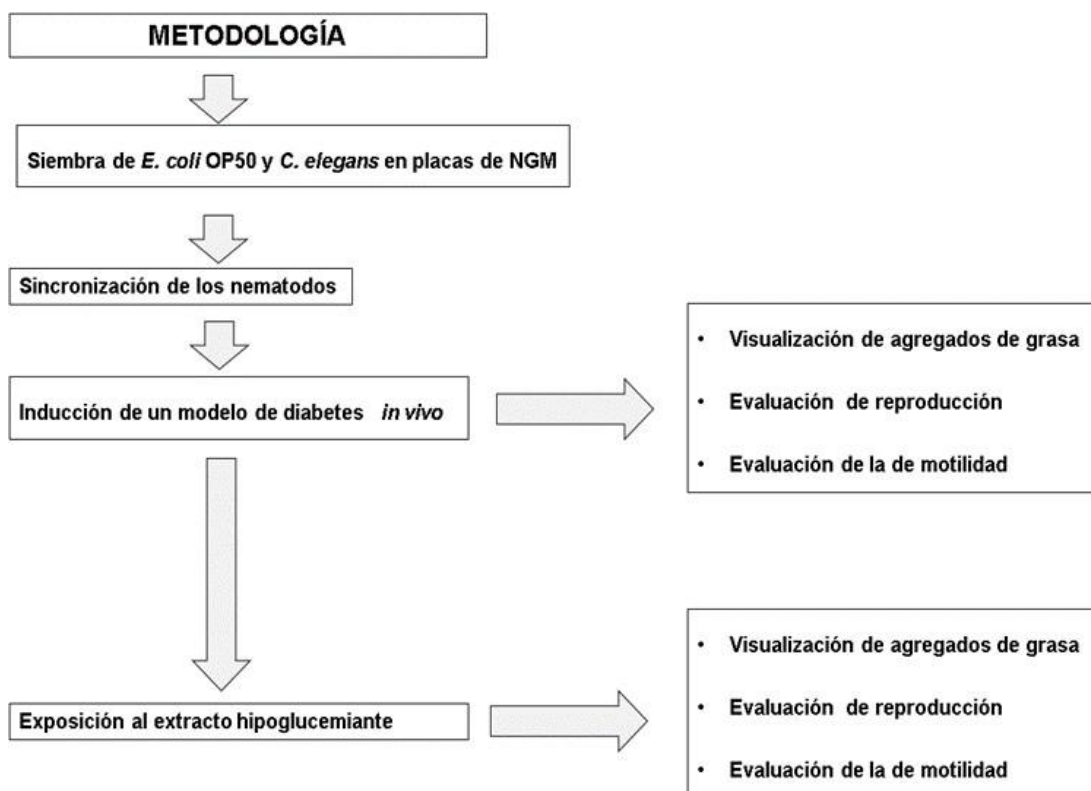


Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología del Estudio Piloto para evaluar los efectos de un extracto hipoglucemiante en la cepa N2 de *C. elegans* como modelo de diabetes inducido.

Siembra de *E. coli* OP50 y *C. elegans* en placas de NGM

A partir de una muestra de la bacteria *E. coli* OP50, se tomó una pequeña cantidad y se sembró en el medio NGM. Se confirmó la presencia de la bacteria mediante una tinción de Gram. Luego, se realizaron repiques individuales de los nematodos cerca del área donde se sembró la bacteria *E. coli*, con el objetivo de observar si los nematodos presentaban un desarrollo normal de sus movimientos de arrastre “*thrashing*” hacia la bacteria.

Además, se utilizó otro método para la siembra de *C. elegans*, que consistió en utilizar un sacabocado. Este método implicó transferir un trozo del medio NGM, en lugar de transferir los nematodos de forma individual. El trozo del medio se depositó boca abajo en una nueva placa de agar, manteniendo una distancia adecuada con respecto a la

bacteria. De esta manera, los nematodos pudieron moverse libremente en el medio y explorar su entorno (Bustos *et al.*, 2017).

Sincronización de los nematodos

Se realizó la sincronización de los nematodos con el fin de obtener una población de larvas homogéneas, en el mismo estadio larvario, Para ello, se dejó crecer el nematodo en las placas NGM y *E. coli* OP50 durante varios días hasta obtener una gran cantidad de huevos y/o hermafroditas con huevos en su interior. El proceso de sincronización se llevaba a cabo utilizando una solución de hipoclorito sódico, que destruye todas las larvas y nematodos adultos sin afectar los huevos (Surco-Laos *et al.*, 2011).

Para llevar a cabo la sincronización de los nematodos, se recogieron huevos y nematodos en los diferentes estados larvarios mediante el lavado de las placas con tampón M9 (3 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 5 g NaCl, 1 mL MgSO₄ 1M, H₂O hasta 1 L, y se esterilizaron mediante autoclave). Durante todo el proceso, el tubo se mantuvo en un baño de hielo para evitar la eclosión de los huevos.

Posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm y 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 20 mL de una solución de hipoclorito sódico al 12%, preparada específicamente para cada uso a partir de una disolución concentrada comercial. Se agitó vigorosamente durante 10 minutos, alternando cada minuto entre agitación y reposo del tubo en hielo. Después de los 10 minutos, se centrifugó la mezcla durante 5 minutos a 3000 rpm y 4 °C, y se eliminó el sobrenadante. Este proceso se repitió una vez más con otros 20 mL de hipoclorito sódico (Surco-Laos *et al.*, 2011). Para eliminar los residuos de huevos sincronizados obtenidos anteriormente y posibles restos de hipoclorito, se realizaron sucesivos lavados con 20 mL de tampón M9. Este proceso se repitió 4 veces.

Inducción de un modelo de diabetes en *C. elegans* cepa N2.

Se preparó medio NGM con una cantidad de 7,2 g de glucosa para lograr una concentración de 14 mmol/L por nematodo, siguiendo la metodología descrita por Schlotterer (2019) y Heestand (2013). A continuación, se realizó la sincronización utilizando una caja con la cepa N2, y los huevos se dejaron en el medio NGM con glucosa. Se permitió el desarrollo de los nematodos y se observaron los efectos sobre la agregación de grasas, motilidad y la reproducción de la cepa N2 una dieta rica en glucosa (Schlotterer *et al.*, 2009; Heestand *et al.*, 2013; Bustos *et al.*, 2017).

Exposición de la cepa N2 al extracto hipoglucemiante

A la preparación de medio NGM se le agregaron diferentes concentraciones del extracto hipoglucemiante de una planta de la familia *Rubiaceae* sp (0.01, 0.1 y 1 mg/mL). Luego, se colocaron nematodos tratados con glucosa (modelo de diabetes) en las placas con *E. coli* OP50 y con el extracto, con el objetivo de observar el efecto del extracto sobre el modelo.

Visualización de acúmulos /agregados de grasa en *C. elegans*

En este estudio, se empleó el tinte Negro Sudán B para evidenciar la acumulación de grasa en la cepa N2, tanto en presencia como en ausencia de glucosa, siguiendo el método descrito por Ashrafi (2007). *C. elegans* almacena grasa en forma de gotas en sus células intestinales e hipodérmicas, debido que el cuerpo del nematodo es transparente, es posible observar estas gotas de grasa. La determinación de grasas se realizó en el modelo de diabetes inducido con y sin hipoglucemiante (Ashrafi, 2007).

Evaluación de reproducción en *C. elegans*

Los nematodos sincronizados se cultivaron en placas con agar NGM con *E. coli* OP50, en presencia o ausencia del extracto hipoglucemiante, según el tratamiento. Se permitió que los nematodos se desarrollaran hasta el estado larvario L4, y luego se transfirieron a nuevas placas. En cada una de estas placas se colocó un nematodo y se dejó que se reprodujera hasta el final de su período reproductivo. Después de esto, las placas con los huevos depositados por los nematodos se incubaron a 20°C, en oscuridad, durante 36 horas para que los huevos eclosionaran y pasaran a los estados larvarios L1 y L2. Finalmente, se realizó un recuento de larvas mediante la observación total de la placa a través de un estereoscopio.

Evaluación de la de motilidad en *C. elegans*

Se contó el número de “*thrashing*” (movimientos del nematodo) durante 30 segundos después de un estímulo con un pick de platino 0,2 µm, en la cola o la cabeza de las larvas L4. Este ensayo se realizó por triplicado tanto en los nematodos con una dieta rica en glucosa (modelo de inducido de diabetes), y los nematodos expuestos al extracto hipoglucemiante.

Análisis estadístico

Las gráficas presentes en este informe y el análisis estadístico correspondiente se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 7.0. Para el análisis estadístico, se utilizó la prueba de análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA) en el programa mencionado.

RESULTADOS

Los resultados evidenciados en este estudio piloto realizado desde el Semillero y el grupo de Investigación Biotecnología y Genética UCMC, evaluaron el efecto de concentraciones elevadas de glucosa en la cepa N2 de *C. elegans*, como modelo de diabetes inducida. Una vez confirmado este modelo mediante una coloración para lípidos, se llevaron a cabo ensayos de motilidad y reproducción para observar los efectos de un extracto hipoglucemiante sobre este modelo.

Caracterización morfológica de los estadios de *C. elegans* N2

Inicialmente, se realizó la observación y caracterización de cada uno de los estados larvarios en la cepa N2 sin exposición a glucosa (Figura 2). Los huevos obtenidos a través de la sincronización fueron transferidos a un nuevo medio NGM con *E. coli* OP50, donde permanecieron durante un período de 14 a 16 horas. Durante este tiempo, ocurrió la eclosión y los nematodos entraron en el estado larvario L1, en el cual no se pueden distinguir los órganos internos del nematodo. Después de aproximadamente 12 horas, los nematodos pasaron al estado larvario L2, donde se observó una mayor complejidad interna y un tamaño mayor en comparación con el estado L1. Aproximadamente 8 horas después, los nematodos alcanzaron el estado larvario L3, en el cual se observó una mayor diferenciación en la estructura interna y un aumento considerable de tamaño. Después de 8 horas, los nematodos llegaron al estado L4, donde se pudo apreciar una estructura interna más definida y un mayor tamaño. Cerca de 10 horas después de alcanzar el estado L4, los nematodos se convirtieron en adultos jóvenes y, tras 8 horas adicionales, pasaron a la etapa de adultos maduros, mostrando una estructura interna bien definida y un tamaño mayor en comparación con la larva L4.

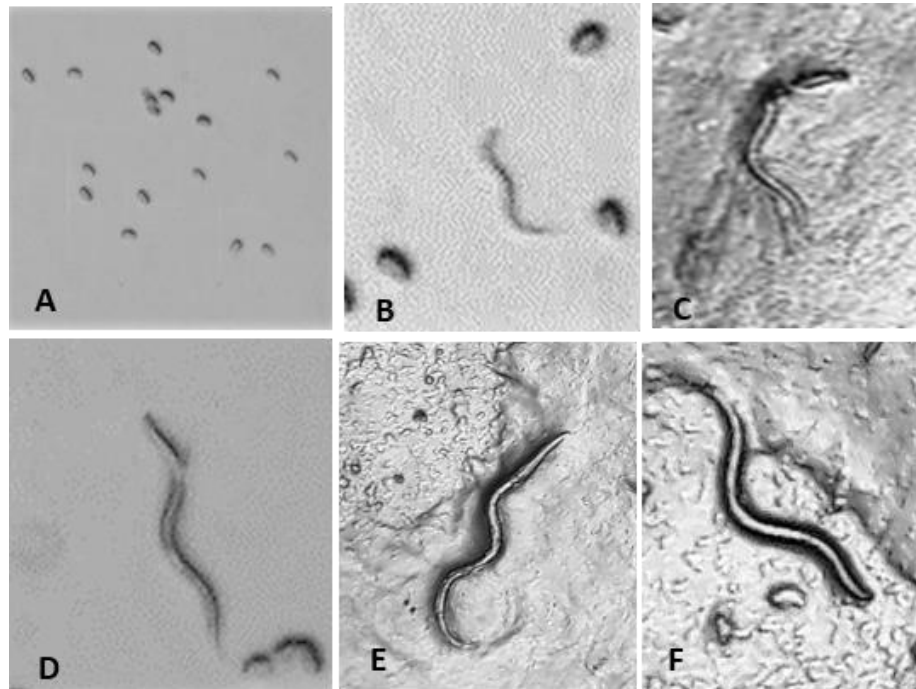


Figura 2 Caracterización Morfológica. A) Sincronización. B) Etapa larva 1, 14 – 16 horas post sincronización. C) Estado larvario L2, 26-28 horas post sincronización. D) Etapa larva 3, 36 horas luego de la sincronización. E) Estado larvario L4, 44 horas post sincronización. F) N2 adulto 48 – 52 horas post sincronización. Cortés & Espitia, (2018). Grupo Biotecnología y genética UCMC-2019.

Evaluación del modelo de diabetes inducida en el nematodo *C. elegans*

El modelo de diabetes inducida en *C. elegans* se estableció siguiendo el protocolo descrito por Schlotterer y colaboradores (2009), donde se agregaron 7,2 g de glucosa al medio líquido para lograr una concentración de 14 mmol/L por nematodo. Este modelo de diabetes inducida permitió observar los efectos y cambios que una dieta rica en glucosa ejerce sobre el nematodo. A continuación, se describen los efectos de la exposición a una dieta rica en glucosa en la morfología, reproducción y motilidad de *C. elegans* N2.

1. Caracterización morfológica

Como control se tomaron nematodos sin glucosa, al observar la cepa N2 durante un periodo de 24 días sin glucosa, se pudo constatar que la morfología del nematodo no presentó cambios. Durante el desarrollo, no se observaron cambios significativos en la morfología del nematodo, y este experimentó un desarrollo normal en cada uno de sus estados larvarios y en su estado adulto hasta el momento de la muerte. En cuanto a la

longitud del nematodo, se pudo observar el aumento gradual acorde con las diferentes etapas de desarrollo. Finalmente, se observaron nematodos con el diámetro esperado a lo largo del desarrollo. Estos resultados concuerdan con los reportes de la literatura.

En términos de la morfología del modelo de diabetes inducida en *C. elegans*, se observó un aumento en el diámetro corporal del nematodo después de la exposición a altas concentraciones de glucosa (acúmulos de grasa) en comparación con los nematodos utilizados como control sin glucosa. Estos cambios morfológicos fueron evaluados mediante observación microscópica y la acumulación de grasa fue corroborada por una tinción con Negro Sudán B (Figura 3).

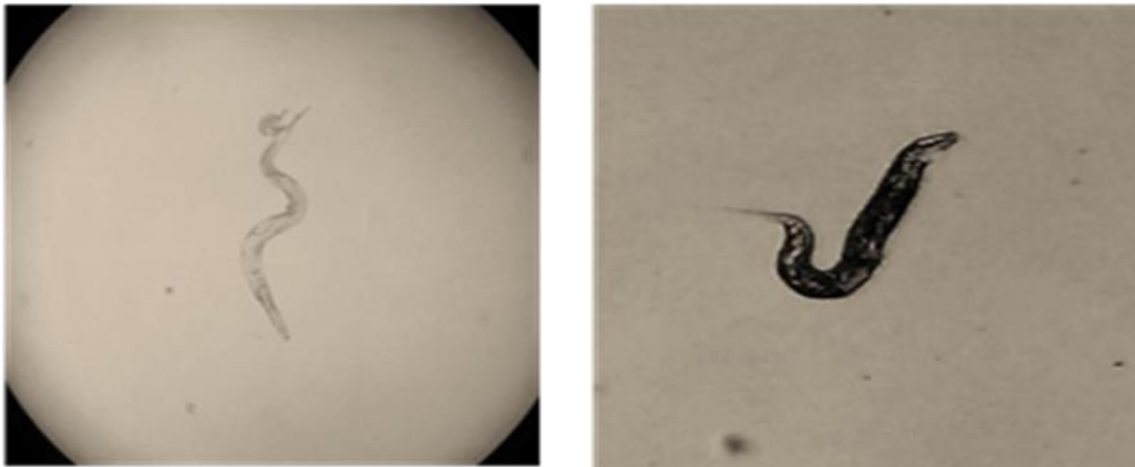


Figura 3. Morfología *C. elegans*. A) Cepa N2 sin glucosa B) cepa N2 con glucosa visto en microscopio objetivo 40X. Cortés & Espitia, (2018). Grupo Biotecnología y genética UCMC-2019.

2. Determinación de agregados de grasas

El cambio en el diámetro del nematodo al exponerse a glucosa sugiere la acumulación de grasa. Para corroborar el modelo, se realizó una tinción con Negro Sudán B, un colorante que tiene afinidad por los lípidos y los colorea en tonos azul rojizo. En la Figura 4, se puede observar un nematodo de la cepa N2 sin ningún tipo de tratamiento, donde no se evidencia una acumulación excesiva de grasa. Sin embargo, al someter la cepa N2 a una dieta rica en glucosa y aplicar la tinción con Negro Sudán B, se pueden observar las gotas de grasa acumuladas a lo largo del cuerpo del nematodo.



Figura 4. Acúmulos de grasa en *C. elegans*. Se evidenció la acumulación de grasa mediante tinción con Negro Sudán B. A) Adulto N2 sin tratamiento. B) Adulto N2 con dieta alta en glucosa. Cortés & Espitia, (2018). Grupo Biotecnología y genética UCMC-2019

3. Evaluación de la motilidad y reproducción

La evaluación de la motilidad del nematodo se realizó teniendo en cuenta el número de “*thrashing*” realizado por cada nematodo ante un estímulo durante 30 segundos. En la cepa N2 silvestre el número de “*thrashing*” en promedio es de 1 por segundo. En cambio, al ser sometido a altas concentraciones de glucosa, se evidencia una reducción significativa en el número de “*thrashing*”. En la Tabla 1 se muestra el número de “*thrashing*” obtenidos tanto en la cepa N2 sin glucosa, como en la cepa N2 con glucosa.

Tabla 1. Número de “*thrashing*” realizados por la cepa control (N2 sin glucosa) y la cepa N2 expuesta a glucosa.

Ensayo de motilidad				
Numero de “ <i>thrashing</i> ” por 30 segundos	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
N2 sin glucosa	29	31	30	30
N2 con glucosa	18	21	16	18,33

Al evaluar la reproducción de la cepa N2 después la exposición dieta rica en glucosa, se observó una notable disminución en la capacidad reproductiva del nematodo con

respecto al control. Al realizar el conteo de las larvas en las etapas L1 y L2 al finalizar el ciclo reproductivo, se obtuvo un promedio de 232 larvas en el grupo de control (N2 sin glucosa), mientras que, en la cepa expuesta a la glucosa, el promedio de larvas disminuyó a 174. Estos resultados indican el efecto negativo que una concentración elevada de glucosa tiene sobre la reproducción de *C. elegans* (Figura 5).

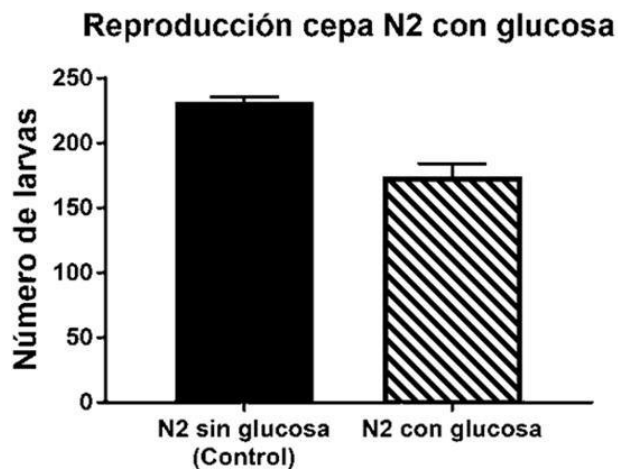


Figura 5. Reproducción cepa N2 expuesta a dieta rica en glucosa. Diagrama de barras, media, desviación estándar. Se observa disminución significativa en la cantidad promedio de larvas en la cepa expuesta a glucosa con respecto a la cepa control (N2 sin glucosa), Cortés & Espitia, (2018). Grupo Biotecnología y genética UCMC-2019

Efecto del extracto hipoglucemiante en un modelo de diabetes inducida en el nematodo *C. elegans*

Posterior a la inducción de diabetes en la cepa N2, los nematodos fueron expuestos a diferentes concentraciones del extracto (0.01, 0.1 y 1 mg/mL), obtenido de las hojas de una planta de la familia *Rubiaceae* sp. con propiedades hipoglucemiantes. El objetivo fue observar los efectos que este extracto ejercía sobre la morfología, reproducción y motilidad en el modelo diabético inducido.

Se observó una mejora en la morfología, reproducción y motilidad de la cepa, especialmente cuando se trató con una concentración de 1 mg/mL del extracto, con respecto al grupo control. Luego de exponer el modelo diabético a cada una de las concentraciones del extracto, se pudo observar una reducción en el diámetro corporal

en la cepa tratada con la concentración 1 mg/mL del extracto hipoglucemiante (Figura 6).

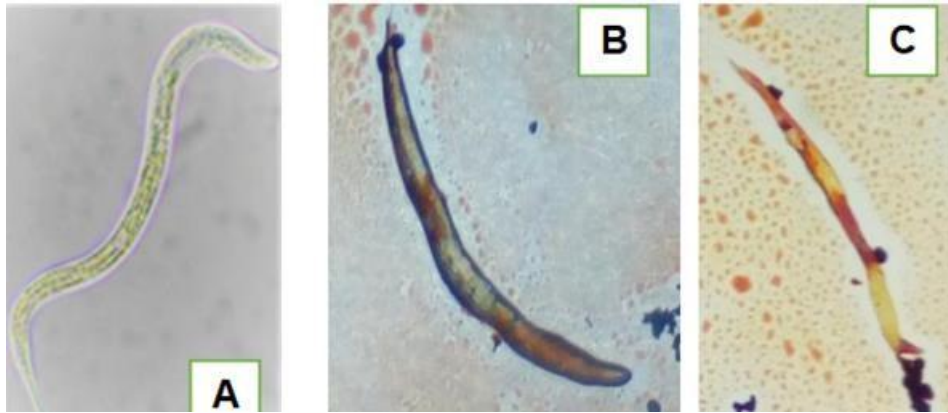


Figura 6: Acúmulos de grasa en *C. elegans*. A) Nematodo adulto N2 sin glucosa. B) Nematodo adulto N2 con glucosa. C) Adulto N2 con glucosa tratado con 1 mg/mL de extracto hipoglucemiante. Cortés & Espitia, (2018). Grupo Biotecnología y genética UCMC-2019.

Después de exponer el modelo de diabetes inducida, a diferentes concentraciones del extracto, se pudo observar una disminución en el diámetro corporal en la cepa tratada con una concentración de 1 mg/mL del extracto.

Al evaluar la reproducción se observó un aumento en la reproducción de *C. elegans*. En el grupo de nematodos expuestos a glucosa, se obtuvo un promedio de 174 larvas en etapa L1 y L2. Sin embargo, al tratar los nematodos con una concentración de 0.01 mg/mL del extracto, el promedio de larvas aumentó a 194. En el caso de la concentración de 0.1 mg/mL, el promedio se incrementó a 209 larvas, y finalmente, al utilizar una concentración de 1 mg/mL del extracto, el promedio fue de 220 larvas. Al comparar estos promedios con el promedio de larvas en el grupo de control sin glucosa (232 larvas), se observa una mejora significativa en la reproducción al exponer los nematodos con dieta rica en glucosa a diferentes concentraciones del extracto. La concentración de 1 mg/mL del extracto fue la más cercana al promedio de larvas del grupo control (Figura 7).

Reproducción N2 diabetes inducido con extracto

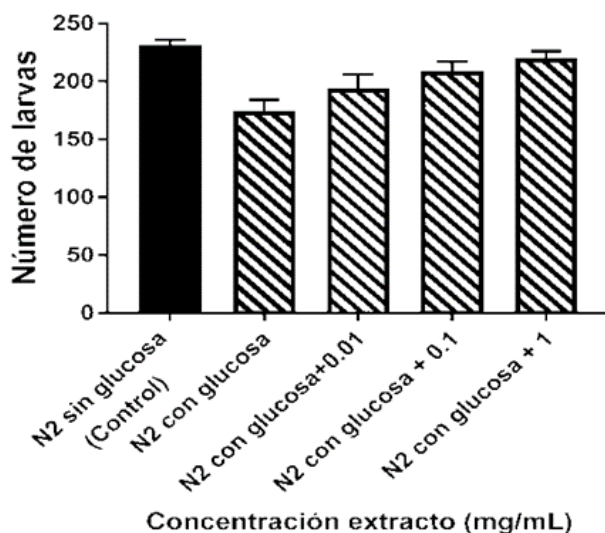


Figura 7. Reproducción modelo *C. elegans* N2 diabetes inducida tratada con extracto. Diagrama de barras, media, desviación estándar. Se observa el comportamiento reproductivo de la cepa N2 sin glucosa, con glucosa, y con tratamiento del extracto a diferentes concentraciones. Se evidencia que hay una recuperación significativa de la reproducción al tratarse la cepa con la mayor concentración del extracto (1mg/mL). GraphPad Prism (One-way ANOVA) $p < 0,0001$. Cortés & Espitia, (2018). Grupo Biotecnología y genética UCMC-2019.

La evaluación de la motilidad de los nematodos mostró en la cepa N2 silvestre un registró en promedio de 1 “*thrashing*” por segundo. Sin embargo, al exponerla a concentraciones elevadas de glucosa, se observó una reducción significativa en el número de “*thrashing*” (tabla No 1). En cuanto a la cepa expuesta previamente a glucosa y posteriormente tratada con las diferentes concentraciones del extracto, se observó una mejoría notable cuando se utilizó la concentración de 1 mg/mL. Por otro lado, se determinó que el extracto utilizado por sí solo no tuvo ningún efecto en la motilidad de los nematodos.

Discusión

El nematodo *C. elegans* es una herramienta de investigación valiosa en el estudio de enfermedades como la diabetes debido a la conservación de proteínas y señalización celular similar a los humanos. Sus características destacadas incluyen su facilidad de manejo y mantenimiento en el laboratorio, su ciclo de vida corto y alta capacidad

reproductiva, lo que lo convierte en un modelo idóneo para investigaciones relevantes (Cooper & Van Raamsdonk, 2018). La relación entre la glucosa y la reproducción y motilidad observada en este estudio resalta la utilidad de *C. elegans* para comprender los efectos de la glucosa en organismos vivos y encontrar posibles enfoques terapéuticos para enfermedades metabólicas relacionadas con la diabetes (Lee *et al.*, 2009). Continuar explorando las propiedades y aplicaciones de este organismo modelo es crucial para avanzar en nuestra comprensión de la biología y fisiología en contextos de salud y enfermedad.

El objetivo de este estudio fue investigar los efectos y las diferencias fenotípicas que resultan de una dieta rica en glucosa y su posterior tratamiento con un extracto hipoglucemiante en el nematodo *C. elegans*, cepa N2. Se enfocó específicamente en la agregación de grasas, capacidad reproductiva y la motilidad del nematodo. El estudio se llevó a cabo con estudiante del semillero y grupo de investigación Biotecnología y Genética UCMC.

El trastorno metabólico de los lípidos se considera un factor de riesgo para el síndrome metabólico, lo que puede resultar en la acumulación de grasa en los músculos y diversos órganos, indicando una alteración en la vía metabólica. Esto, a su vez, puede llevar al desarrollo de enfermedades como diabetes, obesidad, arteriosclerosis, envejecimiento acelerado y disminución de la capacidad reproductiva, lo que representa un importante problema de salud pública (Barquilla, 2019; Lee *et al.*, 2009). Los resultados de este estudio mostraron una disminución en la producción de huevos al tratar los nematodos de *C. elegans* con altas concentraciones de glucosa.

Diversos estudios, entre ellos uno realizado por Hashmi y colaboradores (2013), han evidenciado que el nematodo *C. elegans* comparte homología en el metabolismo de los lípidos con los humanos. Debido a esta similitud, se ha utilizado este organismo como modelo para evaluar diferentes sustancias hipoglucemiantes (Hashmi *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2011). Este enfoque de investigación con *C. elegans* ofrece la posibilidad de obtener información relevante sobre posibles compuestos con efectos hipoglucemiantes, lo que podría tener implicaciones terapéuticas para tratar el trastorno metabólico y las enfermedades asociadas. Estos hallazgos respaldan la utilidad del modelo *C. elegans* en la investigación relacionada con el metabolismo de los lípidos y su potencial para proporcionar perspectivas innovadoras en el campo de la salud y la medicina.

La comunidad científica busca nuevas alternativas para tratar enfermedades como la diabetes y la obesidad. Se han utilizado modelos animales como ratones y el nematodo

C. elegans en numerosos estudios para evaluar los efectos protectores y de recuperación de extractos hipoglucemiantes en la diabetes inducida. Un estudio realizado por Nayak y colaboradores (2011), investigó ciertas frutas y su potencial hepato-protector en ratas con diabetes inducida. Los resultados sugieren perspectivas prometedoras para el desarrollo de opciones terapéuticas basadas en compuestos naturales (Nayak *et al.*, 2011).

Los extractos de plantas ofrecen una amplia gama de efectos hipoglucemiantes, desde la estimulación de la secreción de insulina hasta la mejora de la sensibilidad a esta hormona y la inhibición de la absorción y producción de glucosa. Además, algunos extractos activan vías metabólicas alternativas, como la vía de señalización de AMPK, que contribuyen a mantener los niveles de glucosa en sangre dentro de un rango saludable al mejorar el metabolismo y la captación celular de glucosa (Van Eldik *et al.*, 2008).

Estos modelos animales han demostrado ser herramientas valiosas en la investigación médica y farmacológica para estudiar la eficacia de extractos hipoglucemiantes y otros compuestos en condiciones de enfermedad. La investigación continua en esta área es esencial para aprovechar el potencial de los compuestos naturales en el tratamiento de enfermedades metabólicas y mejorar la calidad de vida de los pacientes (Hernández-Cruz *et al.*, 2023).

Utilizando el método descrito por Iser y colaboradores (2007), se determinó que una concentración de 14 mmol/L de glucosa es suficiente para lograr en el nematodo un nivel de acumulación de grasa corporal similar al observado en mamíferos con altas concentraciones de glucosa en sangre, como ocurre en trastornos como la diabetes (Iser *et al.*, 2007). Al comparar con la cepa N2 silvestre utilizada como control, se pudo evidenciar, mediante la tinción con Negro Sudan B, la presencia de agregados de grasa, lo que se puede correlacionar con alteraciones químicas en la señalización de insulina en la cepa expuesta a altas concentraciones de glucosa (Cortés & Espitia, 2018).

Para explicar la importancia de estos trastornos, se plantean dos teorías sobre la relación de la insulina con la duración de los nematodos. La primera teoría o hipótesis propone que el mecanismo de la insulina tiene un efecto en la reducción o prolongación de la esperanza de vida del nematodo. La segunda teoría o hipótesis sugiere que la insulina determina la capacidad de la célula para soportar el estrés oxidativo de la respiración y media la tasa de envejecimiento. Sin embargo, se sabe que al igual que en los nematodos, la resistencia a la insulina también afecta la longevidad en los seres humanos.

En relación con la reproducción del nematodo, Hodgkin, (1988) establecen que en la cepa N2, el hermafrodita adulto produce ovocitos durante aproximadamente cuatro días Hodgkin, (1988). Después de este periodo fértil de 3-4 días, el adulto maduro vive durante 10-15 días más. Un hermafrodita que se autofecunda puede llegar a producir cerca de 300 descendientes debido a la cantidad limitada de esperma. Sin embargo, cuando ocurre un apareamiento con un macho, el número de descendientes se incrementa a 1200-1400 (Emmons, 2014).

En el presente estudio, se observó un comportamiento reproductivo muy similar en *C. elegans*, con un total de 232 descendientes en la cepa N2 no expuestas a algún tratamiento. Sin embargo, al someter al nematodo a una dieta rica en glucosa, se evidenció una significativa disminución en su capacidad reproductiva, demostrando el efecto negativo de la glucosa en la reproducción de *C. elegans*.

Por otro lado, en el modelo de diabetes inducida y posteriormente tratado con diferentes concentraciones del extracto hipoglucemiante, se observó una recuperación casi completa en la capacidad reproductiva del nematodo. El número de descendientes obtenidos después del tratamiento con el extracto (concentración de 1 mg/mL) fue muy similar al número de descendientes en la cepa control (N2 sin glucosa). Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que el extracto tiene la capacidad de revertir los efectos negativos de la glucosa en el nematodo, tal como lo describen Inada y colaboradores (2017) en uno de sus estudios, donde se establece que el extracto de plantas como la *Morinda citrifolia* tiene efectos positivos en la función metabólica, incluyendo la regulación del peso corporal y los depósitos de grasa, el metabolismo de lípidos y glucosa, así como efectos hepatoprotectores (Inada *et al.*, 2017; Castañeda & Correales, 2020; Cortés & Espitia, 2018).

Asimismo, se evaluó la motilidad del nematodo en condiciones normales, bajo una dieta rica en glucosa y después del tratamiento con las concentraciones del extracto. En la cepa N2 sin glucosa, el número de movimientos “*thrashing*” fue de aproximadamente 1 por segundo. Sin embargo, al administrar altas concentraciones de glucosa a la cepa, se observó una disminución significativa en el número de movimientos del nematodo, lo cual afecta su capacidad de desplazamiento en busca de alimento (Cortés & Espitia, 2018). Al realizar el tratamiento con cada una de las concentraciones del extracto, se observó una recuperación en la capacidad motora del nematodo, especialmente con la concentración de 1 mg/mL del extracto. Esto evidencia el efecto positivo que ejerce el extracto sobre el modelo de Diabetes inducida.

Finalmente, el análisis fenotípico de la cepa silvestre N2 expuesta a glucosa reveló la presencia de agregados de grasas, como se confirmó mediante la tinción con Negro Sudan B. Estos hallazgos sugieren una posible asociación entre la exposición a glucosa y la acumulación de lípidos en este modelo de nematodos. Sin embargo, los resultados del tratamiento hipoglucemiante mostraron una mejora significativa en la reproducción y la motilidad de los nematodos modelo de diabetes inducido, lo que indica un efecto beneficioso en la fisiología de estos organismos frente a las condiciones metabólicas alteradas (Schulz *et al.*, 2007).

Estos hallazgos no solo ofrecen una comprensión más profunda de los mecanismos subyacentes a los trastornos metabólicos, sino que también resaltan el potencial del modelo de *C. elegans* como una herramienta valiosa en la investigación y el desarrollo de terapias para enfermedades metabólicas, ofreciendo nuevas perspectivas en la formación en investigación en este campo.

En Colombia, se han documentado pocos estudios relacionados con este nematodo, lo que lo convierte en un modelo interesante para evaluar patologías relacionadas con el metabolismo (Castañeda & Correales, 2020). Se sugiere realizar estudios adicionales para establecer los componentes específicos de diferentes extractos de plantas que han mostrado actividad hipoglucemiante, con el fin de investigar los diferentes blancos en los que actúan para lograr la recuperación del nematodo.

Conclusión

Una dieta rica en glucosa disminuye la producción de larvas en los nematodos *C. elegans*. Sin embargo, el tratamiento con el extracto hipoglucemiante, especialmente a una concentración de 1 mg/mL, permitió una recuperación significativa en la producción de larvas y mejoró la motilidad del nematodo. Los resultados sugieren una relación proporcional entre la concentración del extracto y la mejora en la motilidad en cepas expuestas a altas concentraciones de glucosa.

En conclusión, los resultados de este estudio piloto indican que el extracto hipoglucemiante de la planta de la familia *Rubiaceae* sp, tiene efectos favorables fenotípicos en las cepas de *C. elegans* expuestas a glucosa. Además, se observó que la mejoría en la motilidad de la cepa N2 expuesta a altas concentraciones de glucosa está relacionada con la concentración del extracto utilizado.

Este estudio piloto permitirá realizar a futuro, la evaluación del metabolismo de la glucosa, y las implicaciones en las rutas metabólicas en el nematodo, y de esta forma,

brindar una herramienta metodológica que permita identificar posibles dianas terapéuticas en el mediano y corto plazo.

El modelo de diabetes inducida en *C. elegans*, es un modelo eficiente y económico en su implementación, de gran utilidad en la formación de estudiantes de pregrado en investigación y fortalecen el semillero y grupo de investigación, el cual es fácilmente escalable para la resolución de preguntas de investigación de posgrado.

REFERENCIAS

- Altun, Z., & Hall, D. (2012, Abril 12). Introduction to *C. elegans* anatomys. In WormAtlas. Recuperado de: <https://www.wormatlas.org/index.html>
- Ashrafi, K. (2007). Obesity and the regulation of fat metabolism. WormBook, 1-20. doi: 10.1895/wormbook.1.130.1.
- Barquilla García, A. (2017). Actualización breve en diabetes para médicos de atención primaria. *Revista Española de Sanidad Penitenciaria*, 19(2), 57-65.
- Bird, A. F., & Bird, J. (2012). *The structure of nematodes*. Academic Press.
- Bustos, A. V. G., Jiménez, M. G., & Mora, R. M. S. (2017). The *Annona muricata* leaf ethanol extract affects mobility and reproduction in mutant strain NB327 *Caenorhabditis elegans*. *Biochemistry and biophysics reports*, 10, 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.04.016>
- Byerly, L., Cassada, R. C., & Russell, R. L. (1976). The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental biology*, 51(1), 23-33.
- C. elegans Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5396), 2012–2018. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2012>
- Castañeda Chávez, Y. A., & Correales Molano, D. A. (2020). Valoración del efecto lipolítico y antioxidante del extracto etanólico de las hojas *Bauhinia variegata* Linn en un modelo

experimental de diabetes inducida *Caenorhabditis elegans*. *Repositorio Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca*.

- Cervantes-Villagrana, R. D., & Presno-Bernal, J. M. (2013). Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células β pancreáticas. *Rev Endocrinol Nutr*, 21(3), 98-106.
- Cooper, J. F., & Van Raamsdonk, J. M. (2018). Modeling Parkinson's Disease in *C. elegans*. *Journal of Parkinson's disease*, 8(1), 17–32. <https://doi.org/10.3233/JPD-171258>
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2), 387-407.
- Cortés Díaz, C. A., & Espitia Martínez, A. J. (2018). Efecto del extracto de *Morinda Citrifolia* en la reproducción y motilidad de *Caenorhabditis Elegans* (Cepa n2) modelo diabetes inducido. *Repositorio Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca*.
- Emmons, S. W. (2014). The development of sexual dimorphism: studies of the *Caenorhabditis elegans* male. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 3(4), 239-262.
- Greenstein, D. (2005). Control of oocyte meiotic maturation and fertilization. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology [Internet]*.
- Hashmi, S., Wang, Y., Parhar, R. S., Collison, K. S., Conca, W., Al-Mohanna, F., & Gaugler, R. (2013). A *C. elegans* model to study human metabolic regulation. *Nutrition & metabolism*, 10(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-10-31>
- Heestand, B. N., Shen, Y., Liu, W., Magner, D. B., Storm, N., Meharg, C., Habermann, B., & Antebi, A. (2013). Dietary restriction induced longevity is mediated by nuclear receptor NHR-62 in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics*, 9(7), e1003651. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003651>
- Hernández-Cruz, E. Y., Eugenio-Pérez, D., Ramírez-Magaña, K. J., & Pedraza-Chaverri, J. (2023). Effects of Vegetal Extracts and Metabolites against Oxidative Stress and Associated Diseases: Studies in *Caenorhabditis elegans*. *ACS omega*, 8(10), 8936–8959. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07025>
- Hodgkin, J. (1988). Sexual dimorphism and sex determination. *The nematode Caenorhabditis elegans*, 243-280.

- Inada, A. C., Figueiredo, P. S., Santos-Eichler, R. A. D., Freitas, K. C., Hiane, P. A., Castro, A. P., & Guimarães, R. C. A. (2017). Morinda citrifolia Linn. (Noni) and Its Potential in Obesity-Related Metabolic Dysfunction. *Nutrients*, 9(6), 540. <https://doi.org/10.3390/nu9060540>
- Iser, W. B., Gami, M. S., & Wolkow, C. A. (2007). Insulin signaling in *Caenorhabditis elegans* regulates both endocrine-like and cell-autonomous outputs. *Developmental biology*, 303(2), 434–447. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.04.467>
- Johnson, T. E., Mitchell, D. H., Kline, S., Kemal, R., & Foy, J. (1984). Arresting development arrests aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of ageing and development*, 28(1), 23–40. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(84\)90150-7](https://doi.org/10.1016/0047-6374(84)90150-7)
- Laakso, M., & Fernandes Silva, L. (2022). Genetics of Type 2 Diabetes: Past, Present, and Future. *Nutrients*, 14(15), 3201. <https://doi.org/10.3390/nu14153201>
- Lee, S. J., Murphy, C. T., & Kenyon, C. (2009). Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell metabolism*, 10(5), 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.10.003>
- Lewis, J. A., & Fleming, J. T. (1995). Basic Culture Methods In *Caenorhabditis elegans*: Modern Biological Analysis of an Organism, vol. 48.
- Nayak, B. S., Marshall, J. R., Isitor, G., & Adogwa, A. (2011). Hypoglycemic and Hepatoprotective Activity of Fermented Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni) in Diabetic Rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2011, 875293. <https://doi.org/10.1155/2011/875293>
- OMS. (2016). Informe mundial sobre la diabetes. WHO Document Production Services. Recuperado de <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/254649/9789243565255-spa.pdf;jsessionid=2E11B18CBCE287AC4812F3D1B3470A71?sequence=1>
- OPS/OMS. (2024). Diabetes. Perfiles de país sobre diabetes. Recuperado de [https://www.paho.org/es/temas/diabetes#:~:text=Se%20estima%20que%2062%20millones,Diabetes%20Atlas%20\(novena%20edici%C3%B3n\)](https://www.paho.org/es/temas/diabetes#:~:text=Se%20estima%20que%2062%20millones,Diabetes%20Atlas%20(novena%20edici%C3%B3n))
- Schlotterer, A., Kukudov, G., Bozorgmehr, F., Hutter, H., Du, X., Oikonomou, D., Ibrahim, Y., Pfisterer, F., Rabbani, N., Thornalley, P., Sayed, A., Fleming, T., Humpert, P., Schwenger, V., Zeier, M., Hamann, A., Stern, D., Brownlee, M., Bierhaus, A., Nawroth,

- P., ... Morcos, M. (2009). *C. elegans* as model for the study of high glucose- mediated life span reduction. *Diabetes*, 58(11), 2450–2456. <https://doi.org/10.2337/db09-0567>
- Schulz, T. J., Zarse, K., Voigt, A., Urban, N., Birringer, M., & Ristow, M. (2007). Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell metabolism*, 6(4), 280–293. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.08.011>
- Singson, A., Mercer, K. B., & L'Hernault, S. W. (1998). The *C. elegans* spe-9 gene encodes a sperm transmembrane protein that contains EGF-like repeats and is required for fertilization. *Cell*, 93(1), 71–79. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81147-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81147-2)
- Surco-Laos, F., Cabello, J., Gómez-Orte, E., González-Manzano, S., González-Paramás, A. M., Santos-Buelga, C., & Dueñas, M. (2011). Effects of O-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*. *Food & function*, 2(8), 445–456. <https://doi.org/10.1039/c1fo10049a>
- Van Eldik, L. J., Carrillo, M. C., Cole, P. E., Feuerbach, D., Greenberg, B. D., Hendrix, J. A., Kennedy, M., Kozauer, N., Margolin, R. A., Molinuevo, J. L., Mueller, R., Ransohoff, R. M., Wilcock, D. M., Bain, L., & Bales, K. (2016). The roles of inflammation and immune mechanisms in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia* (New York, N. Y.), 2(2), 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2016.05.001>
- Worm Atlas. (2024). Introduction to *C. elegans*. Recuperado de <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/IntroductionFrames/Introframeset.html>
- WormBase. (s.f.). *Caenorhabditis elegans*. Recuperado de <https://www.wormbase.org/>
- Yu, Z., & Muehleman, V. (2023). Eating Disorders and Metabolic Diseases. *International journal of environmental research and public health*, 20(3), 2446. <https://doi.org/10.3390/ijerph20032446>
- Zhang, J., Bakheet, R., Parhar, R. S., Huang, C. H., Hussain, M. M., Pan, X., Siddiqui, S. S., & Hashmi, S. (2011). Regulation of fat storage and reproduction by Krüppel-like transcription factor KLF3 and fat-associated genes in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of molecular biology*, 411(3), 537–553. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.06.011>

