



Tomo
2

Diario ^{de} campo Vol. 12

Experiencias en
investigación

Diario de campo

Vol. 12 Tomo 2

Experiencias en investigación



**UNIVERSIDAD COLEGIO
MAYOR DE CUNDINAMARCA**

SELLO EDITORIAL

© 2023, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Bogotá, Colombia

Diario de campo Vol. 12 Tomo 2 Experiencias en investigación
ISBN: 978-958-5198-20-3

María Ruth Hernández Martínez
Rectora

Maricela Botero Grisales
Vicerrectora de Investigación, Innovación y Extensión

Martha Cecilia Torres López
Vicerrectora Académica

Sandra Yulieth Moncada Casanova
Vicerrectora Administrativa y Financiera

Comité Editorial Institucional

Maricela Botero Grisales
Vicerrectora de Investigación, Innovación y Extensión

Dayanna Sánchez Rodríguez
Subdirección de Investigación, Innovación y Desarrollo

Maricela Botero Grisales
Subdirectora de Promoción y Comunicaciones (e)

Lugo Manuel Barbosa Guerrero
Representante de los docentes ante el Consejo Superior Universitario

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Diseño y diagramación
Xpress Estudio Gráfico y Digital SAS - Kimpres
Carrera 69H # 77-40
Concepto de diseño: Viviana del Pilar Torres Trespalcios

Derechos reservados de autor. 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

Presentación

7

Presentación

Capítulo I

13

Hemoglobinopatías y talasemias: un problema de salud pública en el Pacífico Colombiano

Capítulo II

45

Análisis fisicoquímico y microbiológico de leche cruda en dos fincas lecheras de colombia

Capítulo III

71

Polimorfismos en los receptores tipo Toll y susceptibilidad a presentar espondiloartropatías asociado con la infección por *Chlamydia trachomatis*

Capítulo IV

107

Cepa transgénica tj356 de *caenorhabditis elegans* un modelo en toxicología ambiental

Presentación

Diario de Campo – Experiencias en investigación, como espacio de divulgación de avances y resultados, es el escenario que tiene la Subdirección de Investigación, Innovación y Desarrollo de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. En ese sentido, presentamos cuatro capítulos que como ejercicio de divulgación del conocimiento se reúnen en este volumen 12 tomo 2, que de seguro redundará en el saber disciplinar de la Bacteriología y Laboratorio Clínico.

En el capítulo I. Hemoglobinopatías y talasemias un problema de salud pública en el pacífico colombiano, de Martha Leonor Castillo Bohórquez, Ana Lucía Oliveros Rozo y, Ana Isabel Mora Bautista. Las autoras plantean que:

Las hemoglobinopatías tienen impacto mundial principalmente en el Mediterráneo, África, India, Antillas, Oriente Medio, Sudeste Asiático, China y América. Donde aproximadamente el 24.8 % de la población es portadora del gen para anemia falciforme y talasemias.

En América en la época de La Colonia la población de raza negra fue introducida al continente, en países como Brasil, Cuba, Panamá, Venezuela, Colombia y Estados Unidos de América, entre otros. En el boletín epidemiológico de la Organización Mundial de la Salud, se indica como problema de salud pública.

El estudio, pretende caracterizar las alteraciones de la molécula de hemoglobina estructurales y talasemias en población del pacífico, en el que es evidente la presencia de hemoglobinas anormales, conocidas como hemoglobinopatías, y los síndromes talasémicos, en los que se presenta disminución o ausencia de la síntesis de una cadena de estructura normal.

La investigación es de tipo descriptivo; cuantitativa y transversal, no experimental, no probabilística a conveniencia,

diseño muestral: 39 muestras de sangre, total de personas afrodescendientes del pacífico colombiano.

Los resultados obtenidos fueron: 5.1 % de rasgo hemoglobina AS, 5.1 % de hemoglobina AC, 5.1 % de rasgo beta talasemia y, 84.7 % de hemoglobina normal. Son importantes las políticas de educación a la población a través de la consejería genética, para que se conozca la transmisión de estas enfermedades hereditarias, evitar que los hijos padezcan la enfermedad y, además, se favorece el manejo de las políticas de salud pública.

En el capítulo II. Análisis fisicoquímico y microbiológico de leche cruda en dos fincas lecheras de Colombia, las autoras Claudia Lorena Cruz Hernández, Andrea Tatiana Durán-Rodríguez, Jeannette Navarrete Ospina, Gladys Pinilla Bermúdez y, Liliana Constanza Muñoz Molina, establecen que:

El crecimiento en la producción láctea en Colombia es del 1.5 % en los últimos años, especialmente en el sur (departamento de Nariño), en el centro (Altiplano Cundiboyacense) y en el noroccidente (departamento de Antioquia). El componente principal de la leche es el agua y posee características organolépticas como aspecto, olor y sabor; propiedades físicas como densidad, pH y acidez; propiedades químicas como grasa y lactosa; además de su microbiota y carga bacteriana. Estas características y propiedades fisicoquímicas le dan su calidad nutritiva, al igual que su valor como materia prima en la fabricación de alimentos lácteos. En el presente estudio se determinó la calidad fisicoquímica y microbiológica de muestras de leche cruda, procedentes de 14 bovinos de tres razas diferentes en dos fincas lecheras de Colombia seleccionados aleatoriamente y, sin manifestaciones clínicas. Se encontraron porcentajes de grasa disminuidos correlacionados con densidades altas y los parámetros de pH y acidez dentro de los rangos normales. En cuanto a la calidad microbiológica se obtuvieron 41 aislamientos de 56 muestras

analizadas: 27(69.2 %) correspondieron a *Staphylococcus coagulasa* negativa, de los cuales 12 (29.3 %) fueron *Staphylococcus epidermidis*, 1 (2.4 %) *Staphylococcus aureus*, 1 (2.4 %) *Streptococcus agalactiae*, 4 (10 %) fueron *Serratias liquefaciens* y 8 (16. %), pertenecieron a otros cocos Gram positivos. Los resultados evidenciaron variedad de microbiota en las muestras de leche cruda recolectadas, lo que es de gran interés debido a que una exposición prolongada a este tipo de microorganismos aumenta el riesgo del desarrollo de mastitis clínica, subclínica y ambiental, por lo que toma gran relevancia implementar medidas de control que promuevan y garanticen la calidad higiénica de la leche y el bienestar de los bovinos.

En el capítulo III. Polimorfismos en los receptores tipo toll y susceptibilidad a presentar espondiloartropatías asociado con la infección por *Chlamydia trachomatis*, las autoras Ruth Mélida Sánchez Mora, Dayana Rodríguez Morales y, Gabriela Arévalo Pinzón, encontraron que:

Las espondiloartropatías son enfermedades inflamatorias crónicas, la artritis reactiva o síndrome de Reiter (ARe), es una enfermedad inflamatoria que pertenece a este grupo, al igual que la artritis reumatoidea autoinmune, se diferencia de esta por ser asimétrica, presentar factor reumatoideo negativo y estar asociada a procesos infecciosos. Su forma de presentación puede ser: venérea y disintérica. La forma venérea de ARe se ha asociado con *Chlamydia trachomatis*, con una incidencia anual del 5 % de casos en Estados Unidos. La forma disintérica está asociada a Salmonella, Shigella, Yersinia o Campylobacter, por consumo de alimentos contaminados. Ambas formas infecciosas tienen en común que se presentan en individuos genéticamente susceptibles al alelo de histocompatibilidad HLA-B27.

Los pacientes con ARe presentan la triada clásica (uretritis, conjuntivitis y artritis), aunque también pueden verse

comprometidos los tendones, articulaciones, las palmas de las manos y las plantas de los pies con lesiones típicas, así como lesiones mucocutáneas, descamación en la zona más externa de los órganos genitales, úlceras no dolorosas en la boca y conjuntivitis. Los síntomas en la forma venérea son principalmente dolor, irritación o secreciones tanto vaginales como en el pene. Todos estos síntomas afectan la calidad de vida de los pacientes.

El grupo de Biotecnología y Genética UCMC, viene adelantado estudios en pacientes con artritis reactiva o síndrome de Reiter (ARe) y su asociación con *C. trachomatis*. Esta revisión busca dilucidar el papel de los TLRs y los recortes presentados en la literatura a nivel mundial, que han sido relacionados con espondiloartropatías y su asociación con *C. trachomatis*.

Para cerrar este tomo, en el Capítulo IV. Cepa transgénica TJ356 de *Caenorhabditis elegans* un modelo en toxicología ambiental, las autoras Ruth Mérida Sánchez Mora, Viviana Andrea Gualteros Bustos y, Martha Gómez Jiménez, dan por hecho que:

Caenorhabditis elegans como modelo biológico de estudio ha permitido lograr grandes avances en áreas de investigación como ingeniería genética, ambiental, medicina, biotecnología, entre otras; gracias a la modificación genética de los individuos para posterior expresión de proteínas específicas y un gen reportero que permite evidenciar la presencia de las mismas, su fácil manejo en un microambiente generado en el laboratorio, mantenimiento económico, ciclo de vida corto y características fisiológicas apreciables.

Dentro de las ramas de investigación en las que es utilizado el nematodo se encuentra la toxicología, con la realización de bioensayos que permiten medir la respuesta biológica y el efecto del agente a evaluar, ello bajo condiciones experimentales específicas y controladas. En esta área es en la cual cobra importancia el uso del nematodo,

ya que la contaminación de los recursos hídricos es una situación que va en aumento, siendo necesario la evaluación de estos contaminantes sobre modelos biológicos, que permitan establecer la afección o no sobre el ecosistema y sus posibles consecuencias a nivel ambiental.

Es así como la minería ilegal y el crecimiento de cultivos ilícitos en Colombia, han generado un impacto ambiental devastador a través de los últimos años, generando desertización de terrenos, contaminación (con metales pesados) de fuentes hídricas y efectos negativos en los ecosistemas. Además, las poblaciones que más lo padecen son las aledañas a ríos contaminados que son alimentados por diversas fuentes hídricas afectadas por la minería ilegal y los cultivos ilícitos. La contaminación de los ríos se ha convertido en problema de salud pública, se han reportado casos de personas con daño en el sistema nervioso central, problemas dermatológicos y, renales, entre otros.

En la actualidad se emplea al nematodo *C. elegans* como modelo en investigación de tóxicos a nivel ambiental, su uso permite comprender mecanismos de patologías humanas como las enfermedades neurodegenerativas, por su homología con el humano y fácil análisis de sus características fisiológicas. La cepa transgénica TJ356 de *C. elegans* se ha utilizado como modelo en longevidad, supervivencia al stress térmico y oxidativo, por lo que permite evidenciar la toxicidad de compuestos ambientales.

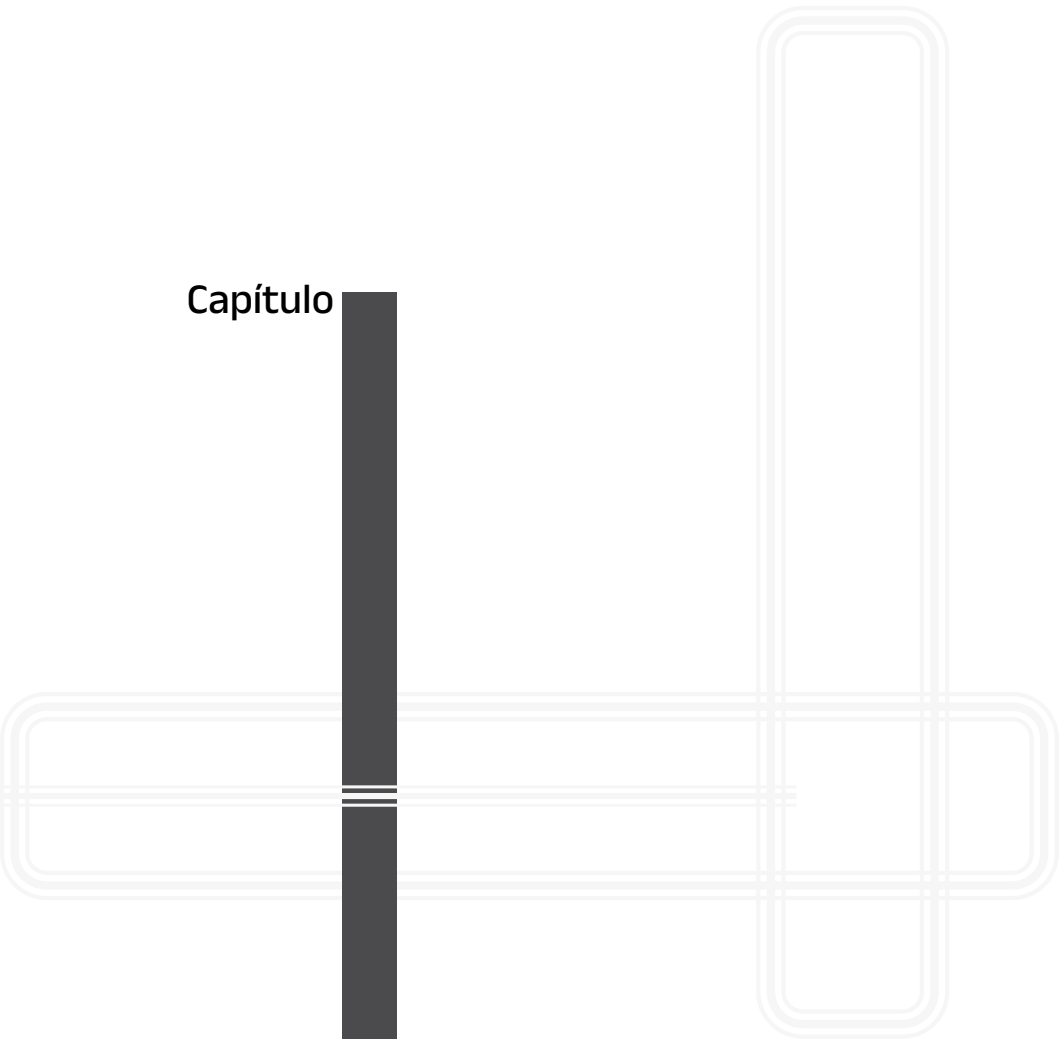
Finalmente, se invita a consultar el volumen 12 tomo 3 de la *Serie Diario de Campo*, que contiene los capítulos:

- Transmedia colaborativa: Memoria visual histórica núcleos fundacionales de Bogotá, de Martha Cecilia Torres López, Claudia Marleny Rodríguez Colmenares y, Juan Felipe González Franco.
- Sobrantes de construcción en el almacén de obra —Estudio de caso— de Sandra Milena Benítez Villamizar y, Yolanda Andrea Gómez Uribe.

- Herramientas facilitadoras para el desarrollo del Dialogo de Saberes con Mujeres Rurales, de María Lucero Ramírez Mahecha, Yuri Alicia Chávez Plazas y, Judith Elena Camacho Kurmen.
- Turismo y pobreza en el centro histórico de Bogotá, de Édgar Salatiel Bejarano Martínez y, Juan Felipe Quintero Leguizamón.

Juan Alberto Blanco Puentes
Área de Sello Editorial

Capítulo



Hemoglobinopatías y talasemias un problema de salud pública en el pacífico colombiano*

Martha Leonor Castillo Bohórquez**

Ana Lucía Oliveros Rozo***

Ana Isabel Mora Bautista****

Introducción

En Colombia, en los boletines informativos emitidos por el Instituto Nacional de Salud sobre drepanocitosis (2016 y 2017) y, el Informe Quincenal Epidemiológico Nacional, 1 (15 de enero, 2018) se aprecia que estas enfermedades van en aumento, razón por la cual es muy importante diagnosticar estas alteraciones en la molécula de hemoglobina, desde la óptica de salud pública a nivel de comunidad afrodescendiente, identificar el síndrome hemolítico asociado a alteraciones de la cadena de hemoglobina, tales como hemoglobina S, hemoglobina C y, talasemias, con el fin de concientizar acerca de la

* Proyecto aprobado según acuerdo según Acuerdo No. 93 de 2019. Titulado: Caracterización de anemias ferropénicas y alteraciones genéticas en la molécula de hemoglobina en comunidad afrodescendiente del pacífico colombiano. Grupo ERITRON.

** Magister en evaluación en Educación, Universidad Santo Tomás, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Docente. E-mail: mlcastillo@unicolmayor.edu.co

*** Magister en evaluación en Educación, Universidad Santo Tomás, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Docente. E-mail: aoliveros@unicolmayor.edu.co

**** Magister en evaluación en Educación, Universidad Santo Tomás, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Docente. E-mail: aimora@unicolmayor.edu.co

importancia de un diagnóstico apropiado para el mejor manejo de estas alteraciones, tanto a nivel clínico como de consejería genética, en busca de mejorar la calidad de vida y reducir costos en tratamientos, teniendo en cuenta, que en un futuro cercano se cambiará el perfil epidemiológico a nivel nacional por el aumento del desplazamiento de estas poblaciones (Castillo *et al.*, 2014)

Son relevantes las consideraciones aportadas por la comunidad científica en el contexto de las alteraciones de la molécula de hemoglobina. Las personas con rasgo falciforme que son portadoras de la hemoglobina S, son asintomáticas, las cifras del hemograma y la morfología sanguínea es normal, el desarrollo físico, la actividad y la longevidad de las personas es normal; sin embargo, frente a circunstancias de anoxia, puede presentar ocasionalmente complicaciones (Castillo *et al.*, 2014). La situación de orden público, la pobreza y falta de oportunidades en zonas rurales ha incrementado la migración de población afrodescendiente a las ciudades y, en especial a Bogotá, ciudad ubicada a 2600 msnm, y que conlleva mayor agresividad en la sintomatología de las personas portadoras y homocigotas de hemoglobinopatías, es importante su diagnóstico oportuno y adecuado en el que no se confunda anemias por deficiencias de hierro con rasgo talasémico.

La hemoglobina S se produce por la sustitución del ácido glutámico por valina, en la posición 6 de la cadena β de la hemoglobina y al descender la PO₂, la molécula de hemoglobina se cristaliza, deformando los hematíes, tomando forma falciforme y rígidos, esto, produce un grupo de síntomas conocidos como crisis celular de la hoz. El riesgo de padecer una crisis aumenta con cualquier actividad que estimule la necesidad del cuerpo para recibir oxígeno, como el enfermarse, el estrés físico y las altitudes elevadas; de esta forma los factores de riesgo incluyen a su vez:

Factores Genéticos: los niños que heredan copias del gen defectuoso de ambos padres, padecen de la anemia falciforme. Los niños que heredan una copia del gen no presentarán esta enfermedad, pero portarán este rasgo.

- Raza: negra procedente del Sub-Sahara.

- Etnicidad: griegos, italianos y personas de algunas partes de la India y de la Península Árábica (Frédéric *et al.*, 2017; Walter *et al.*, 2017).

El proyecto pretende, desde la óptica de salud pública a nivel de comunidad afrodescendiente, identificar la presencia del estado anémico carencial posiblemente combinado con el síndrome hemolítico asociado a alteraciones de la cadena de hemoglobina, tales como hemoglobina S, hemoglobina C y talasemias (Adorno *et al.*, (2015), con el fin de concientizar acerca de la importancia de un diagnóstico apropiado para el mejor manejo de estas alteraciones, tanto a nivel clínico como de consejería genética en busca de mejorar la calidad de vida y reducir costos en tratamientos, así como dar a conocer los resultados a las entidades competentes, puesto que en un futuro cercano se cambiará el perfil epidemiológico a nivel nacional teniendo en cuenta las condiciones de desplazamiento de estas poblaciones (Castillo *et al.*, 2014).

Tabla 1. Tipo de hemoglobinas normales

Tipo de HB	Cadenas	Etapas de desarrollo
Hb A	Alfa2 - beta2	Adulta normal (96 %)
Hb A2	Alfa2 - delta2	Adulta normal (3 -3.5 %)
Hb F	Alfa2 - gamma2	Adulta normal (1 %) Fetal (98%)
Fetal (98 %)	Universidad Javeriana	(170 créditos)
Gower I	Zeta2 - epxilon2	Embrionaria
Gower II	Alfa2 - epxilon2	Embrionaria
Portland	Zeta2 - gamma2	Embrionaria

Fuente: elaboración propia.

Alteraciones de la molécula de hemoglobina

Las hemoglobinopatías son un grupo de trastornos hereditarios en los cuales hay una estructura y producción anormal de la molécula de hemoglobina. Dichos trastornos genéticos se dividen en dos grupos principales: Talasemia y variantes estructurales de la hemoglobina. Ambas son causadas por mutaciones y o deleciones en los genes Alfa o Beta globina. Cuando los defectos de genes causan trastornos de síntesis de las globinas da lugar a la Talasemia, pero la estructura de hemoglobina en estos casos es normal; de otro lado, cuando se producen cambios en la estructura de hemoglobina, da lugar a la hemoglobina anormal. También hay muchas formas mixtas que combina características de ambos grupos como la hemoglobina S, C y hemoglobina E, Alfa-talasemia (Kohne, 2011; Kuder *et al.*, 2014).

Los defectos de la hemoglobina son clasificados como enfermedades endémicas. Así mismo, las pruebas de hemoglobina tales como electroforesis de hemoglobina están indicadas especialmente en: anemia microcítica hipocrómica, después de haberse descartado la deficiencia de hierro, anemia hemolítica crónica, anemia inducida por medicamentos, eritrocitosis o cianosis causada por factores hematológicos, hidropesía fetal de etiología poco clara, prevención, después de haber diagnosticado familiares en una asesoría genética y diagnóstico prenatal (Cao *et al.*, 2010).

Síndromes de talasemia

El nombre talasemias se asigna a un conjunto de anormalidades genéticas de la hemoglobina, debidas a un daño en la síntesis parcial o total de la cadena de globina. El termino talasemia proviene del griego (*thalassa* y *haima*) que significa mar y sangre respectivamente, se alude porque estas anemias se presentaban con mayor frecuencia en las zonas cercanas al mar mediterráneo (Peng *et al.*, 2013; Ahmad, 2008; Sillero, 2012).

Las talasemias se clasifican según el nombre de la cadena de globina cuya síntesis se encuentra disminuida. De este modo hay talasemia Alfa, Beta, Delta y Gama, siendo Alfa y Beta las que tienen mayor importancia clínica. Los términos talasemia “mayor”, “menor”, “intermedia” y “mínima” se utilizan para indicar la gravedad clínica, y no necesariamente su carácter hereditario homocigoto y heterocigoto. Las talasemias Alfa y Beta son además subdivididas en formas α^0 y β^0 , en las cuales no se produce la cadena afectada y en formas α^+ y β^+ cuando la cadena se sintetiza, pero en cantidad reducida (Risch, 2011).

B- Talasemia

En este tipo de talasemia se encuentra alterada la cadena beta de la hemoglobina. Los primeros reportes de talasemia datan de 1925. Los casos iniciales fueron descritos en una población pediátrica entre pacientes con anemia, rasgos faciales peculiares y cambios a nivel óseo. Más adelante, el término talasemia fue acuñado por George Whipple. A lo largo de los años, la investigación se centró en la genética y fisiopatología. Hoy en día se considera como un defecto en la síntesis de las cadenas beta-globina, que conduce a alfa / beta desequilibrio, eritropoyesis ineficaz y, la anemia crónica (Haddad *et al.*, 2014).

El espectro de talasemias es amplio, con un extremo que comprende talasemia menor, que consta de anemia microcítica hipocrómica suave sin manifestaciones clínicas obvias, mientras que en el otro extremo talasemia mayor se caracteriza por los pacientes que presentan en sus primeros años de vida anemia profunda y necesidades de transfusión regulares para la supervivencia. Los pacientes con talasemia mayor suelen requerir trasfusión de sangre en los dos primeros años de vida y no pueden sobrevivir sino con transfusión regular. Pacientes con talasemia intermedia solo requieren transfusiones tardías, es decir, no tan pequeños y pueden no ser regulares. Los pacientes con talasemia intermedia con frecuencia desarrollan úlceras en las piernas y tienen una mayor predisposición a la formación de trombos, especialmente si han sido esplenectomizados, en contraste

con los principales pacientes con talasemia mayor, tales eventos incluyen la trombosis venosa profunda, derrame cerebral y embolismo pulmonar; los de talasemia menor suelen ser asintomáticos con anemia leve, pero a veces pueden tener anemia moderada (Origa, 2018).

La talasemia es la enfermedad heterogénea más común del ser humano. Es una enfermedad de alta prevalencia en el Mediterráneo, la India, norte de China, y las poblaciones del Pacífico. Cada año, 100.000 recién nacidos nacen con hemoglobinopatías en todo el mundo (Chaves, 2000).

Figura 1. Talasemia beta. Foto tomada por las autoras.

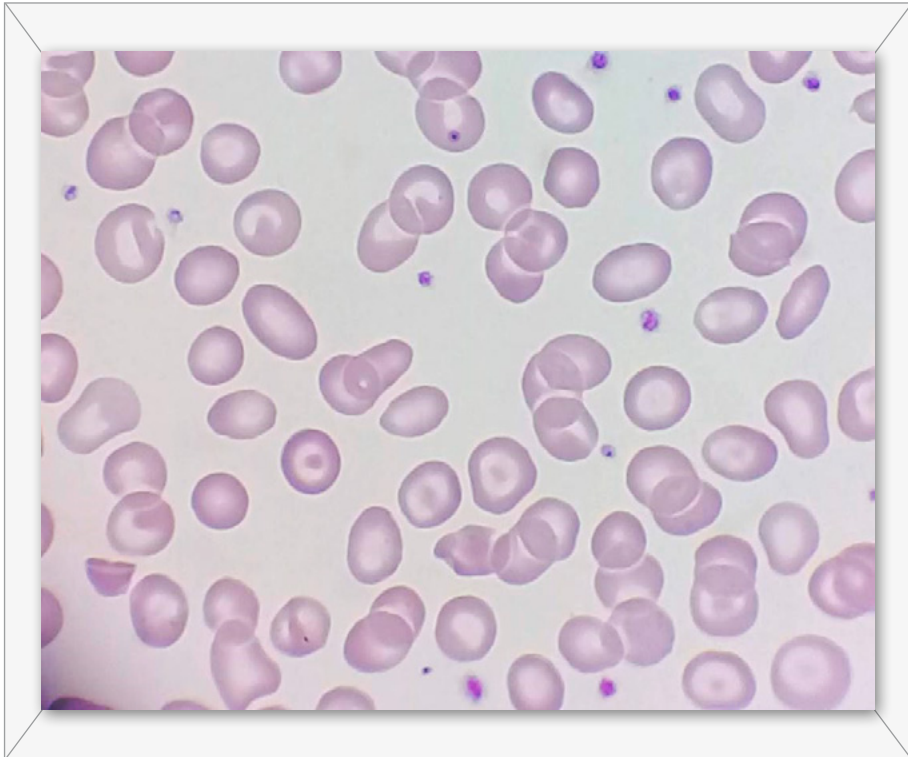
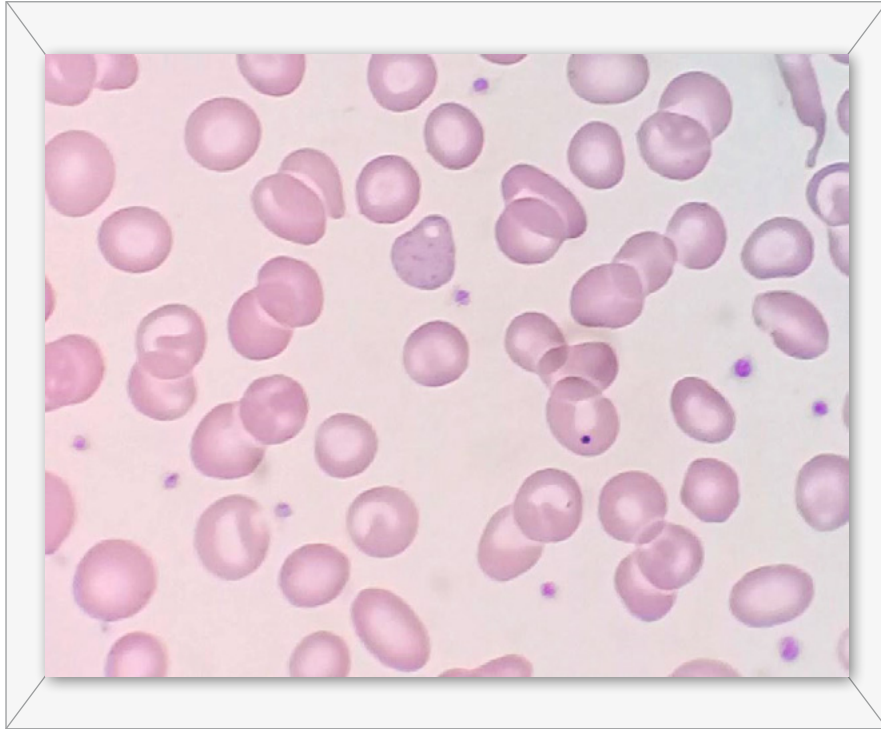


Tabla 2. Talasemias beta

Clasificación talasemia beta		
Forma heterocigota		Forma homocigota
Talasemia menor (rasgo de β talasemia menor)	Talasemia intermedia	Talasemia mayor (anemia cooley)
Producción disminuida de la cadena Beta. Generalmente asintomática. Puede existir anemia microcítica hipocrómica leve.	Ausencia de síntesis de cadena Beta. Similar a una talasemia mayor, pero con menor intensidad. Anemia leve. Hiperesplenismo, colelitiasis, hematopoyesis extramedular, sobrecarga progresiva de hierro. Reticulocitos aumentados.	Esplenomegalia, ictericia y anemia severa microcítica hipocrómica, codocitos, normoblastos, punteado basófilo desde el nacimiento. Transfusiones regulares. Sobrecarga de hierro a largo plazo con afectación cardíaca y hemocromatosis. Hiperesplenismo: citopenias. Alteraciones óseas. Retraso del crecimiento corporal.

Fuente: elaboración propia.

Figura 2. Beta – talasemia mayor. Foto tomada por las autoras.



Las beta-talasemias se heredan de forma autosómica recesiva. Los fenotipos homocigotos de beta talasemias incluyen talasemia mayor e intermedia. La severidad clínica depende del desbalance de las cadenas de globina. Los puntos críticos de la presentación de los síntomas en la Beta talasemia mayor es a cortas edades, desde los 2 años hasta los 6 años, con diarrea, irritabilidad, picos febriles frecuentes, ensanchamiento del abdomen, indicando una posible esplenomegalia.

Si el diagnóstico y así mismo, las transfusiones sanguíneas se llevan a cabo entre las edades mencionadas, manteniéndose una hemoglobina entre 9.5 g/dL hasta 10.5 g/dL puede haber un crecimiento normal hasta los 11 años. Después de esta edad empiezan a presentarse complicaciones por las sobrecargas de hierro debido a las continuas transfusiones y son necesarias las terapias de quelación del mismo,

el paciente presenta retardo en el crecimiento, fallas en la maduración sexual, problemas a largo plazo cardíacos, del hígado (fibrosis y cirrosis) y de glándulas endocrinas (resultando en diabetes mellitus, insuficiencia de la paratiroides, tiroides, pituitaria). La beta talasemia mayor se caracteriza por presentar un aumento en la HbA2 y de HbF (Calabreze, 2009).

Beta - talasemia intermedia

Los pacientes con esta variedad de Beta – talasemia, generalmente se presentan a atención médica en la infancia tardía o incluso en la edad adulta. Ellos muestran una anemia leve y un nivel de hemoglobina que van entre 7 g/dL y 10 g/dL, que es sostenible sin la necesidad de la terapia de transfusión regular. Pueden presentar complicaciones, tales como eritropoyesis ineficaz, absorción de hierro secundaria, hematopoyesis extramedular (EMH), la hemólisis intra y extravascular e hipercoagulabilidad. La eritropoyesis extramedular es un mecanismo de compensación de la médula ósea para superar la anemia crónica. Como consecuencia hay deformidades características del hueso y de la cara, la osteoporosis con fracturas patológicas de los huesos largos y la formación de masas eritropoyéticas que afecta principalmente: bazo, hígado, ganglios linfáticos, pecho y columna vertebral. Los pacientes con talasemia intermedia frecuentemente desarrollan úlceras en las piernas y tienen mayor predisposición a la trombosis en comparación con talasemia mayor, sobre todo si se esplenectomiza. Estos eventos incluyen la trombosis venosa profunda, trombosis de la vena porta, el accidente cerebrovascular y la embolia pulmonar (Calabreze, 2009). La anemia resultante es una consecuencia de la eritropoyesis ineficaz; la anemia crónica, finalmente, conduce a un estado de absorción de hierro continua, que lleva a la sobrecarga de hierro y todas sus complicaciones resultantes (cardíaca, hepática, endocrina, etc.) (Schrier, 2002).

Beta – talasemia menor

Los pacientes con este tipo de talasemias, generalmente son clínicamente asintomáticos; sin embargo, pueden presentar anemia leve (Mohammdai-Asl, 2015; Chaves, 2000).

Diagnóstico hematológico beta talasemia

Los índices RBC muestran anemia microcítica. En la talasemia mayor se caracteriza por la reducción del nivel de Hb (<7 g / dL), volumen corpuscular medio (MCV) > 50 <70 fl y la Hb corpuscular media (MCH) > 12 <20 pg. La talasemia intermedia se caracteriza por niveles de Hb entre 7 y 10 g / dL, VCM entre 50 y 80 fl y MCH entre 16 y 24 pg. La talasemia menor se caracteriza por la disminución MCV y MCH, con el aumento de nivel de Hb A2 (Danjou, 2012).

Frotis de sangre periférica

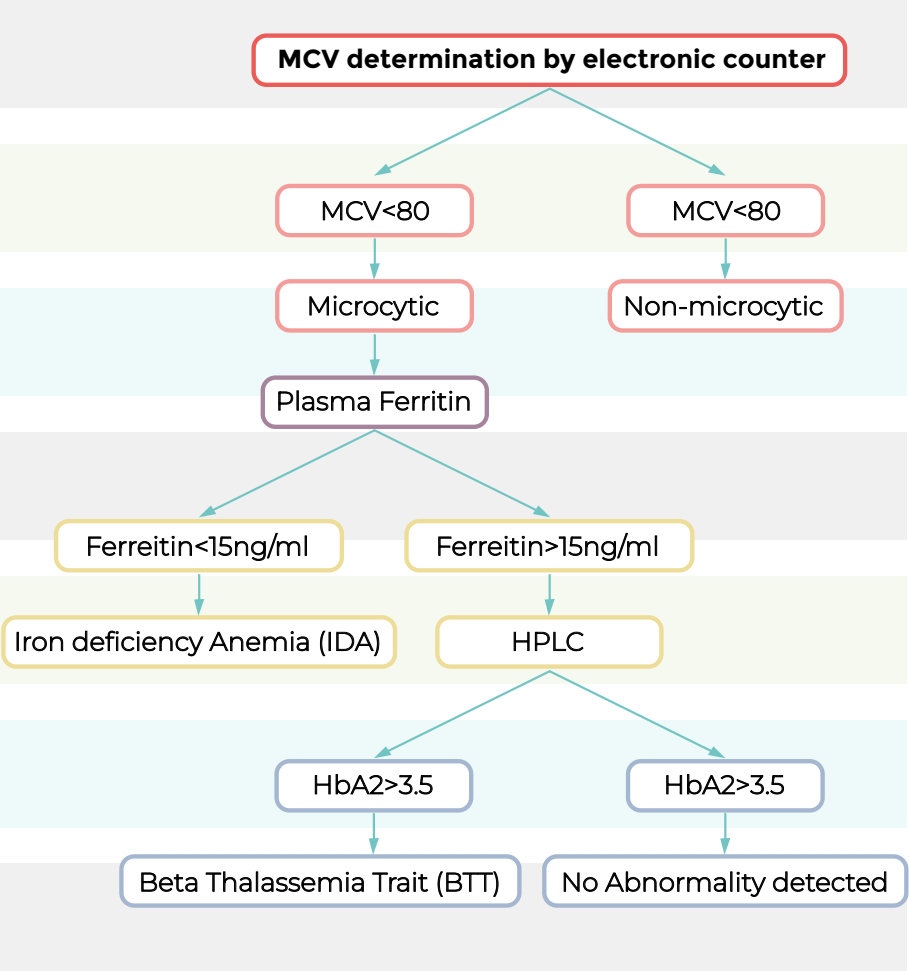
Las personas afectadas muestran eritrocitos con cambios morfológicos [microcitosis, hipocromía, anisocitosis, poiquilocitosis (lágrima espiculada y células alargadas, codocitos)] y, glóbulos rojos nucleados (eritroblastos). El número de eritroblastos se relaciona con el grado de anemia y se incrementa marcadamente después de la esplenectomía (Massey, 2000).

Los portadores tienen cambios morfológicos en los glóbulos rojos menos fuertes. Eritroblastos normalmente no se ven. El análisis de hemoglobina cualitativa y cuantitativa (por electroforesis en acetato de celulosa y DE-52 microchromatography o HPLC) identifica la cantidad y el tipo de Hemoglobina presentes (Old, 2016).

El patrón de la hemoglobina en beta-talasemia varía según el tipo de beta-talasemia. En la beta talasemia 0, homocigotos la HbA

está ausente y la HbF constituye el 92 %-95 % de la hemoglobina total. En beta + talasemia homocigotos y beta + / beta 0, los niveles de HbA tienen entre 10 % y 30 % y HbF entre 70 %-90 %. HbA2 es variable en beta talasémicos homocigotos y se ve aumentada en beta talasemia menor (Ching-Nam *et al.*, 2001; Verhovsek *et al.*, 2012).

Figura 3. Diagnóstico Beta talasemia mediante hemograma, ferritina y electroforesis. K, (Aseem *et al.*, 2009).



Diagnóstico diferencial

La hemoglobina es un elemento esencial en las células rojas y, es la responsable del transporte de gases a través del cuerpo. La hemoglobina A es un heterotetramero de dos subunidades alfa y de dos subunidades beta de globinas, con un grupo hemo incrustado en cada cadena. La composición normal de la hemoglobina en los recién nacidos es del 60 %-85 % de Hb Fetal ($\alpha_2\gamma_2$) y de un 15 %-40 % de hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$). Mientras que la hemoglobina A2 ($\alpha_2\delta_2$) es casi incalculable. Durante el primer año de vida los niveles de Hb A2 deben someterse a un leve incremento 2.5 %-3.5 % de la composición total de hemoglobina. La hemoglobina A2 es considerada como un marcador esencial de diagnóstico de rasgo de beta talasemia, en estado menor, con estudios realizados se sabe que un nivel por encima del 3.5 % es una característica diagnóstica de rasgo de beta talasemia. Una anemia con deficiencia de hierro tiene los niveles de HbA2 reducidos, ya que esta patología modula la síntesis de la cadena delta (Khosa, 2015).

El criterio diagnóstico para rasgo de beta talasemia son los niveles de hemoglobina A₂ elevados, a diferencia de la anemia por deficiencia de hierro, ya que ésta reduce la síntesis de hemoglobina A2, solo aquellos que comparten una misma condición de anemia ferropénica y de talasemia pueden tener éstos niveles altos. Algunos factores socio-económicos como las pocas facilidades de acudir a un diagnóstico, el costo de diagnóstico molecular, la inconciencia frente a estas enfermedades, entre otros, dificultan la detección de estas patologías. La talasemia es el desorden genético más común en el mundo. Hasta la fecha más de 200 defectos moleculares han sido descritos en el gen de beta globina causando beta talasemia (Usman *et al.*, 2011).

Así mismo, la anemia por deficiencia de hierro es la anemia microcítica hipocrómica más común en el mundo. La hemoglobina A₂ está compuesta por dos cadenas alfa y dos cadenas delta. La disminución de A₂ y a la disminución de los niveles de hierro puede ser debido a la disminución de la transcripción y/o traslación del gen delta. Otra posible explicación es la competencia entre las cadenas

beta de la Hb A y las cadenas delta de la Hb A2 en la unión a las cantidades limitadas de hierro o disposición de sus grupos hemo (Ghosh, 2015).

Pocos comparten similitudes con beta-talasemia homocigota:

- Las anemias sideroblásticas determinadas genéticamente se diferencian fácilmente por sideroblastos en anillo en la médula ósea y la concentración sérica de forma variable elevada de protoporfirina eritrocitaria. La mayoría de las anemias sideroblásticas están asociadas con defectos en la vía de biosíntesis de hemo, especialmente del ácido delta-aminolevulínico sintetasa.
- Las anemias diseritropoyéticas congénitas no tienen alta HbF y tienen otras características distintivas, como multinuclearidad de los precursores de glóbulos rojos. Unas condiciones adquiridas asociados con alta HbF (leucemia mielomonocítica crónica juvenil con cariotipo normal y anemia aplásica, tanto congénitas como adquiridas durante la fase de recuperación), se pueden confundir con beta-talasemia, aunque tienen características clínicas y hematológicas distintivas.

Los portadores de beta-talasemia típicos se identificaron por análisis de los índices de RBC, que muestra microcitosis (bajo MCV) y la reducción de contenido de Hb por célula roja (bajo MCH) y, por análisis de Hb cualitativa y cuantitativa, que muestra el aumento de HbA2.

Complicaciones mayores

Las complicaciones en el corazón son la causa principal de muerte en la talasemia mayor y esta es consecuencia de la sobrecarga de hierro. Pacientes con talasemia intermedia son menos propensos a problemas cardiacos. Dentro de las complicaciones cardiacas encontradas en la mayoría de los pacientes están la insuficiencia cardiaca congestiva, cambios pericárdicos crónicos y problemas valvulares

(Carvajal, 2019). La esplenomegalia se presenta junto a un aumento de la tasa de destrucción de los glóbulos rojos. En los fenotipos más severos a menudo progresa rápidamente en los primeros años de vida, mientras que, en los casos leves, no alcanza un tamaño mayor que 5 cm - 6 cm por debajo del borde costal.

La complicación tromboembolítica ocurre con más eventos venosos en talasemia intermedia y con eventos arteriales en talasemia mayor; sin embargo, son más comunes en la intermedia (Carvajal, 2019).

Las complicaciones endocrinas dependen de la severidad de la anemia y de la carga de hierro con la que se encuentre. El hipogonadismo es la complicación más frecuente, afectando más a pacientes femeninos que masculinos, seguido de diabetes, oligospermia y azoospermia y, por último, casi siempre el embarazo suele tener complicaciones (Carvajal, 2019).

La osteoporosis es la causa más común en morbilidad en pacientes con alfa talasemia, asociado a la vez con fracturas, deficiencia de vitamina D y baja densidad mineral en los huesos, junto a expansión de la médula ósea (Clarke *et al.*, 2000).

Diferencias entre anemia ferropénica y Beta Talasemia

La anemia ferropénica y las talasemias, clínicamente presentan parámetros similares como: los glóbulos rojos, microcítica e hipocrómicos, estos dos trastornos de la hemoglobina son las causas más comunes de anemia en niños y en adultos; por lo tanto, es importante determinar si la anemia se da por una disminución de hierro sérico o por alteración genética. Por esta razón, es de importancia realizar los exámenes necesarios para evitar confusiones entre los dos tipos de anemias, los más importantes son la prueba de ferritina plasmática y, los niveles de HbA2 y HbF, presentándose así sospecha de rasgo de beta talasemia, cuando la ferritina plasmática es mayor a 15 $\mu\text{g} / \text{L}$ y

HbA2 mayor a 3.5 %, mientras que los niveles disminuidos de ferritina plasmática pueden ser sospecha de anemia ferropénica que se define como ferritina menor a 15 μ g /L y HbA2 menor de 3.5 % (Tarazi *et al.*, 2008).

La importancia de diagnosticar el rasgo talasémico radica en que muchas veces las poblaciones predispuestas a este tipo de enfermedad tienden a contraer matrimonio entre personas de la misma población o comunidad, lo cual puede ser riesgoso en caso que lleguen a tener hijos, ya que ambos pueden ser portadores de rasgo de talasemia y, lo cual causaría talasemia mayor en el individuo; queda así claro que la detección de rasgo de beta talasemia depende de la medición precisa de HbA2 y HbF; no obstante, se han realizado estudios en donde se presentan los dos trastornos de hemoglobina como se describe en el siguiente aparte (Tiwari *et al.*, 2009).

Coexistencia de anemia ferropénica y síndromes de talasemias

La literatura ha considerado que la diferencia entre estas dos anemias son los niveles de hierro, los cuales disminuyen en anemia ferropénica y no en síndromes talasémicos; sin embargo, en los últimos años se han realizado estudios que demuestran una disminución de hemoglobina más marcada cuando hay deficiencia de hierro y al tiempo existe rasgo de Beta talasemia, lo que provoca una coexistencia entre anemia ferropénica y Beta talasemia. Esto se da debido a la falta de nutrientes hematopoyéticos y además, el desequilibrio en la síntesis de cadenas de globina (Usman *et al.*, 2009).

Tabla 3. Talasemia alfa

Clasificación talasemia beta				
Fenotipo	Porcentaje de globina alfa	Número de genes funcionales de cadena alfa	Genotipo	Datos hematológico
Normal	100	4	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Normal
Portador silencioso	75	3	$-\alpha'/\alpha\alpha$	Normal
Talasemia α menor	50	2	$-\alpha'/-\alpha$ $--/\alpha\alpha$	Anemia microcítica hipocrómica (codocitos)
Hemoglobina H	25	1	$-\alpha'/--$	Anemia hemolítica esplenomegalia
Hidropesía fetal	0	0	$--/--$	Aborto anemia grave Hipoxia intrauterina grave, edema hepatoesplenomegalia

Fuente: elaboración propia.

Alfa - Talasemia

Las α talasemias son alteraciones hereditarias caracterizadas por una delección de uno o ambos genes de α globina. Los genes de la globina se encuentran duplicados (aa/aa), ubicándose en el cromosoma 16 (Rodak, 2014).

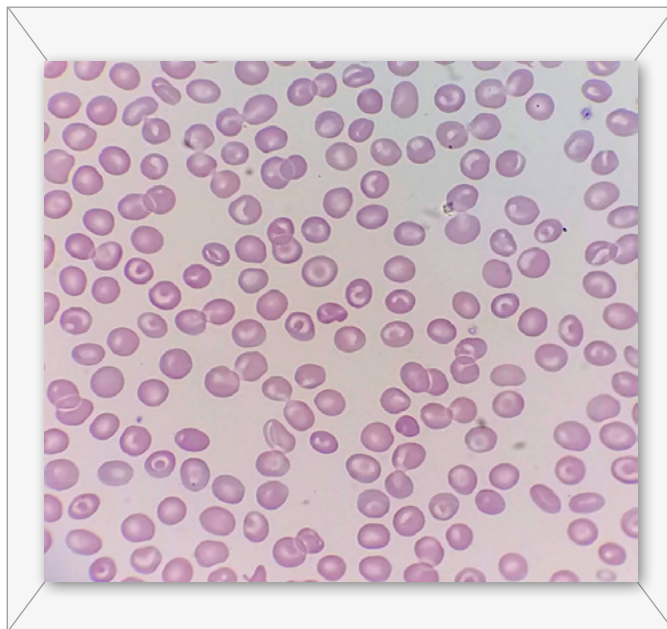
Tiene diferentes formas clínicas que proceden de genotipos diferentes:

La α talasemias con genotipo (- -/- -) es el resultado de la falta de los cuatro genes α constituye la manifestación clínica más grave de las talasemias y es incompatible con la vida, causando aborto prematuro cerca de las 30 semana de embarazo, esta condición genera *hydrops fetalis* o hidropesía fetal por hemoglobina de Bart (Morales, 2017).

La α talasemias genotipo (- a/aa) acude a la forma más leve de la enfermedad, puede cursar con una afección asintomática, ya que los genes de alfa compensan la producción de la cadena, se dice que estos pacientes tienen cerca de 1 % – 2 % de hemoglobina de Bart al nacer (Morales, 2017).

La α talasemias genotipo (a -/a-), (- -/aa) que falta uno de cada grupo de gen o dos de un solo grupo respectivamente, esta condición se le denomina rasgo alfa talasémico, se caracteriza por tener una leve anemia y la sangre tiene un 5 % de hemoglobina de Bart al nacer; por último, se encuentra la α talasemias genotipo (- -/-a) sólo se encuentra en los grupos de genes un solo alfa, constituye una anemia de leve a moderada con dismorfía eritrocitaria, al nacer estos pacientes tienen más de 5 % de hemoglobina de Bart y pueden tener una vida normal (Morales, 2017).

Figura 4. Hemoglobinopatía C. Foto tomada por las autoras.



La HbC (Hemoglobinopatía C) fue la primera hemoglobinopatía descrita después de la HbS y se encuentra casi con exclusividad en la población de raza negra afrodescendiente. Spaet y Ranney informaron esta enfermedad en el estado homocigoto (HbCC) en 1953. El rasgo de hemoglobina C (HbAC) es el estado heterocigoto, en el que la HbC se hereda junto con la hemoglobina normal (Braunstein, 2019).

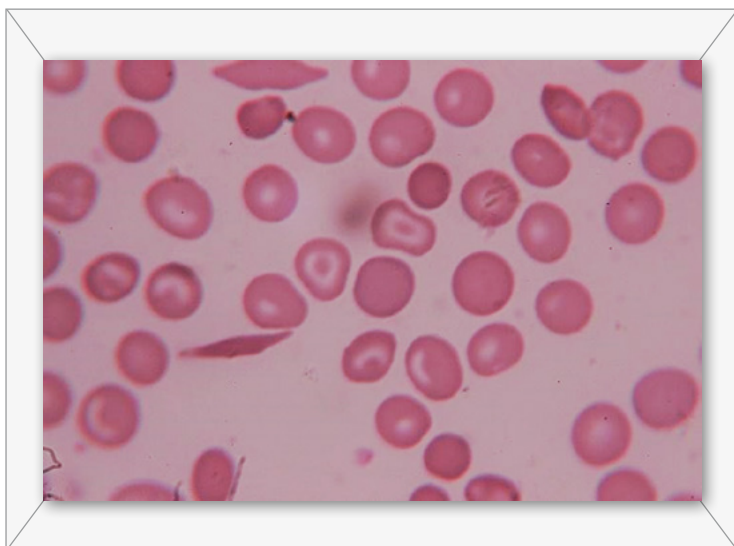
Desarrollo de la enfermedad

En la HbC la lisina reemplaza al ácido glutámico en la sexta posición de la cadena beta. La hemoglobina C se encuentra en el 17 % al 28 % de las personas de ascendencia africana occidental y en el 2 % al 3 % de la población negra norteamericana. Es la variante más frecuente en los Estados Unidos y la tercera en frecuencia en el mundo (Braunstein, 2019).

Diagnóstico en el laboratorio

En los homocigotos para HbC hay una anemia normocrómica normocítica. En ocasiones puede encontrarse cierto grado de microcitosis y una hipocromía leve. El VCM y la CHCM son normales o están aumentados. Hay un aumento marcado en el número de células en diana y reticulocitos. Puede haber eritrocitos nucleados o no. Dentro del eritrocito se forman cristales tetragonales de HbC que pueden verse en el FSP o extendido de sangre. En algunas células la hemoglobina se concentra dentro de los límites del cristal. Los cristales se tiñen con gran intensidad y por lo tanto varían en tamaño y parecen rectangulares, con extremos en forma de pirámide o en punta. El diagnóstico definitivo se establece por electroforesis ácida de hemoglobina. No hay HbA en la HbCC. En el rasgo (HbAC) se encuentra alrededor de un 60 % de HbA y un 30 % de HbC. En agar acetato de celulosa en pH alcalino, la hemoglobina C migra con el mismo patrón que la HbA2, la HbE y la HbO-Arab. La HbC se diferencia de las otras hemoglobinopatías en agar citrato a PH ácido (Braunstein, 2019).

Figura 5. Hemoglobinopatía S. Foto tomada por las autoras.



La anemia de células falciformes la observó por primera vez en 1910 un médico de Chicago, James Herrick, en un estudiante antillano que padecía una anemia grave. En 1917 Emmel, notó que la formación de células falciformes tenía lugar tanto en pacientes no anémicos como en los que padecían anemia muy grave. La base patológica del trastorno y su relación con la molécula de la hemoglobina las describieron Hahn y Gillespie en 1927. Estos autores demostraron que la formación de células falciformes sucedía cuando una suspensión de eritrocitos era deficiente en oxígeno y que la forma de los eritrocitos era reversible cuando esa suspensión se oxigenaba de nuevo. En 1949 Pauling demostró que, cuando la HbSS se somete a electroforesis, migra con un patrón diferente al de la HbAA. Se demostró que esta diferencia era secundaria a la sustitución de un aminoácido en la cadena de la globina. Pauling y cols. establecieron la base genética del trastorno y distinguieron con claridad el rasgo falciforme, con su forma heterocigota (HbAS), del estado homocigoto (HbSS) (Bustamante *et al.*, 2002; Duran *et al.*, 2012).

En un estudio realizado por Robert Hebbel y sus colegas, demostraron que el componente hemo de la hemoglobina tiende a liberarse de la proteína debido a episodios repetidos de la polimerización de la hemoglobina S. Algunos de estos grupos hemo libres tienden a alojarse en la membrana de los hematíes, el hierro de este grupo promueve la formación de componentes llamados especies reactivas de oxígeno. Estas moléculas dañan los componentes lipídicos y proteicos de la membrana de los glóbulos rojos, produciendo su destrucción (hemólisis). Por lo tanto, en la anemia falciforme se incrementa la hemólisis y desciende el valor de la hemoglobina y el hematocrito aproximadamente a la mitad del valor normal

Las enfermedades de células falciformes (ECF) son las hemoglobinopatías más frecuentes y engloban un grupo de trastornos hereditarios caracterizados por la presencia de HbSS sola o HbS en combinación con otra mutación de la cadena beta de la Hb. Las variantes más frecuentes de la enfermedad son la HbSC y la HbS-B-talasemia (HbS/B tal).

Genética

Los genes que contienen la información genética para cada cadena de globina normal y anormal se localizan en loci específicos en los cromosomas 16 y 11. El componente proteico de la hemoglobina está formado por 4 subunidades, 2 cadenas alfa y 2 cadenas beta del tipo de las globinas, el gen para la beta globina está localizado sobre el cromosoma 11, p 15.5 y tiene 475 variantes alélicas, este es un miembro de la familia de los genes de la globina, que es un grupo involucrado en el transporte del oxígeno. Los genes alfa están en el cromosoma 16, que también contiene la codificación para las cadenas zeta de la hemoglobina embrionaria. El gen beta se localiza en el brazo corto del cromosoma 11. Cada cadena tiene dos loci; por lo tanto, las variantes de hemoglobina beta se heredan de forma codominante autosómica, con un gen de cada padre.

La hemoglobina S se debe a un cambio en el codón GAC normal, que pasa a GTG, que da como resultado la sustitución del aminoácido ácido glutámico por valina, en la posición 6 de la cadena beta, resultando una hemoglobina anormal, que es la hemoglobina S, en lugar de la hemoglobina A normal. En estudios realizados en padres de niños con drepanocitosis revelan que hasta un 40 % de su hemoglobina es anormal. Este gen es autosómico y su herencia sigue un patrón mendeliano común y corriente; sin embargo, el hecho que el paciente heterocigoto tenga niveles importantes de hemoglobina S indica que el gen se comporta como codominante (Bustamante *et al.*, 2002; Duran *et al.*, 2012).

Los pacientes con enfermedad de células falciformes (SS), enfermedad SC o HbS/B-talasemia heredaron un gen falciforme (S) de un padre y/o un gen S, C o de B-talasemia del otro. Los individuos homocigotos padecen una enfermedad más grave que los heterocigotos para HbS.

Metodología

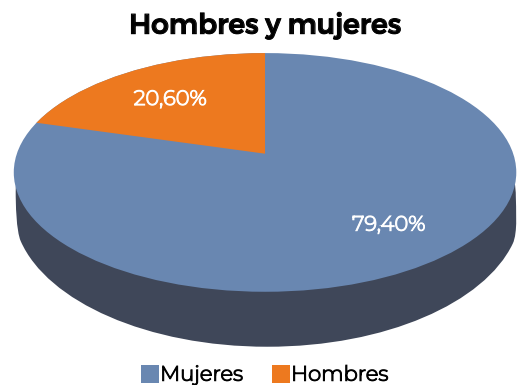
Muestreo no probabilístico de tipo intencional, a conveniencia. Población de afrodescendientes del pacífico colombiano La población objeto de estudio de esta investigación hombres y mujeres adultas afrodescendientes. La muestra sanguínea corresponde a 39 participantes que cumplan los siguientes criterios de inclusión: mujeres y hombres entre 18-20 años del pacífico colombiano y afrodescendiente; y, criterio de exclusión: menores de 18 años. La muestra corresponde a sangre total con EDTA, a la cual se le realizó electroforesis de hemoglobina alcalina y ácida. La investigación no requiere cálculo muestral.

Resultados

Se analizaron 39 muestras de afrodescendientes del pacífico colombiano, de los cuales 79.4 % (31/39) son mujeres y 20.6 % (8/39) hombres. En los resultados, el 15.3 % son portadores de hemoglobinopatías y talasemias, distribuidos así: 5.1 % (2/39) con Hemoglobina AS, 5.1 % (2/39) con Hemoglobina AC y 5.1 % (2/39) con rasgo de beta talasemia.

Tabla 4. Hombres y mujeres

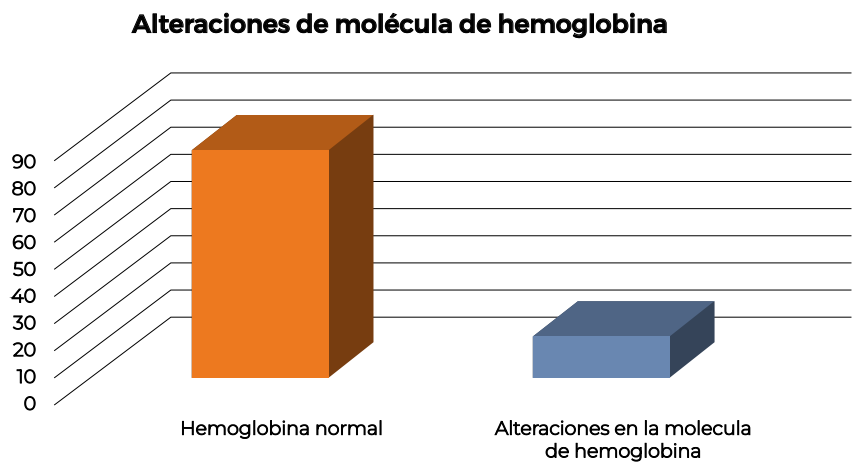
Hombres y mujeres	
Mujeres	79.4 %
Hombres	20.6 %



Fuente: elaboración propia.

Tabla 5. Alteraciones en la molécula de hemoglobina

Alteraciones en la molecula de hemoglobina	
Hemoglobina normal	84,7 %
Alteraciones en la molécula de hemoglobina	15,3 %

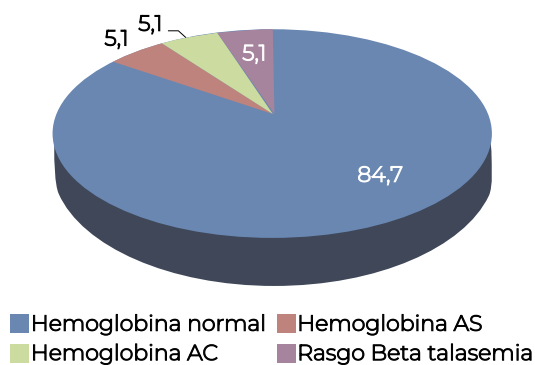


Fuente: elaboración propia.

Tabla 6. Tipos de hemoglobina encontradas en los participantes

Tipo de hemoglobina	Número	Porcentaje
Hemoglobina Normal	33	84,7
Hemoglobina AS	2	5,1
Hemoglobina AC	2	5,1
Rasgo Beta talasemia	2	5,1

Tipos de hemoglobina encontrados en los participantes



Fuente: elaboración propia.

Discusión

Las hemoglobinopatías estructurales y las talasemias constituyen un problema de salud pública, debido a que son enfermedades genéticas de manejo de alto costo, en algunas zonas del pacífico colombiano, se ha comprobado las alteraciones en la molécula de hemoglobina con presencia de rasgos talasémicos y de hemoglobino-

patías, de ahí la importancia de estudiarlas y diferenciarlas de manera apropiada (Bernal *et al.*, 2019).

En estudios realizados en poblaciones afrodescendientes (Rose-ro *et al.*, 2012), se ha evidenciado la variación de estas alteraciones, tanto de manera homocigota, así como en la mayoría heterocigoto, con rasgos HbS, HbC y β talasemias (Castillo *et al.*, 2014), lo que se correlaciona con los datos aportados por el DANE, cuando menciona que en las regiones tropicales del continente americano es muy variable la sintomatología en cuanto a factores genéticos, geográficos, ecológicos y culturales, dependiendo de la alteración, todo esto determina la variabilidad, incidencia, prevalencia y forma de presentación de la enfermedad (DANE, 2014).

En investigaciones realizadas en Colombia se ha descrito que el fenotipo más frecuente en el país es el rasgo de Hemoglobina AS (Satzábal, 2004). Las condiciones socioeconómicas de poblaciones de bajos ingresos y la ausencia de políticas de tamizaje neonatal, no permiten realizar un diagnóstico oportuno y al no presentar sintomatología, puede pasar desapercibido, pero al haber cambios bruscos en las condiciones fisiológicas desencadenan hemólisis, además el desplazamiento de poblaciones afrodescendientes a ciudades de diferentes alturas sobre el nivel del mar ocasiona la exacerbación de la enfermedad originando problemas de salud pública (Moddel y Darlison, 2008).

Las regiones donde se encuentra la mayor población afrodescendiente de Colombia son Chocó, Valle del Cauca y Cauca, lo que podría indicar mayor prevalencia de las alteraciones de la hemoglobina en estos departamentos. La frecuencia del gen falciforme varía entre el 7,7 % y el 14,7 % en la población de raza negra, principalmente en el departamento del Chocó.

Conclusiones

En el estudio se analizaron 39 muestras de personas afrodescendientes del pacífico colombiano de los cuales 31 son mujeres y 8 hombres.

El resultado que se obtuvo evidenció que el 15.3 % presenta alteraciones estructurales y talasemias en la molécula de hemoglobina.

En cuanto a alteraciones genéticas en la molécula de hemoglobina, se encontró: rasgo de hemoglobina AC en 5.1 % (2/39), rasgo de hemoglobina AS 5.1 % (2/39) y rasgo de beta talasemias en 5.1 % (2/39).

Es importante la realización de estudios poblacionales para determinar incidencia de enfermedades genéticas relacionadas con la molécula de hemoglobina y teniendo en cuenta la migración de poblaciones afrodescendientes, implementar políticas de consejería genética que informe acerca de las características de las enfermedades para evitar el aumento de portadores y enfermos de manera que se conozcan las consecuencias de transmitir genes alterados.

Otro punto importante es promover el tamizaje obligatorio en todos los recién nacidos, para tomar medidas de prevención que favorezcan la salud pública en el país.

Referencias bibliográficas

Adorno, E. V., *et al.*, (2015) Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cad. Saúde Pública* 21(1): 292-298. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2005000100032>

Ahmad, G. (2008). *Lineamientos para el manejo clínico de la talasemia*. Argentina.

Aseem, K. T. (2009). Comparing prevalence of Iron Deficiency Anemia and Beta Thalassemia Trait in microcytic and non-microcytic blood donors: suggested algorithm for donor screening. *Asian J Transfus*; 3:99-102.

Bernal, M., Collazos, A., Bonilla, R. D., Tascón, E. P. (2010). Determination of the prevalence of hemoglobin S, C, D, and G in neonates from Buenaventura, Colombia. *Colomb. Med* 42(2):141-147. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95342010000200005

Braunstein, M. (2019). *Enfermedades de la hemoglobina C, S-C y E*. www.msmanuals.com

Bustamante, Z., García, R., Martínez, G., (2012). *Genética, Características de la Hemoglobina S, anemia falciforme y haplotipos*. http://www.dfpd.edu.uy/cerp/cerp_norte/cn/Biologia/BIODIV/Anemia_%20falciforme-%20polimorfismo-%20ECI%20260511.pdf

Calabrese, T., (2009). Iron overload in thalassaemia intermedia: reassessment of iron chelation strategies. *British Journal of Haematology*. (147):634-640.

Cao, A., Galanello, R. (2010). Beta-thalassemia. *Genetics in medicine*, 12, 61-76.

Carvajal, M. (2019). Talasemia: Fisiopatología de la sobrecarga de Hierro. *Iron Health Alliance* <http://www.ironhealthalliance.com/es/diseasesstates/thalassemia/pathophysiology.jsp>

Castillo, M., Mora, A., Oliveros, A., (2014). Association of thalassemia and trait, sickle cell and trait and haemoglobin c with iron-deficiency anemia in colombians of african descent, *Journal of Sciences*. (8): 11.

Castillo, M., Oliveros, A., (2014). Caracterización de alteraciones en la molécula de hemoglobina en afrodescendientes colombianos. *NOVA*, 12 (22).

Chaves, M. (2000). Síndromes de Beta Talasemia Menor o Heterocigota. Aspectos Analíticos-Diagnósticos. <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v9n1/art10.pdf>

Ching-Nan, Ou., Chery, I L., (2001). Diagnosis of hemoglobinopathies: electrophoresis vs.HPLC. *Clin Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 313(1-2):187-194.

Clarke, Higgins, (2000). Laborator and investigation of haemoglobinopathies and thalassaemias. *Review. Clin Chem*. 46(8 Pt 2):1284-90.5.

Danjou, F., Anni, F., Perseu, L. (2012). Genetic modifiers of β -thalassemia and clinical severity as assessed by age at first transfusion. *Haematologica*, 97(7):989-993.

Durán, C., Morales, O., Echeverri, S., Isaza, M., (2012). Haplotipos del Gen de La Globina Beta en Portadores de Hemoglobina S en Colombia. *Biomédica*, 32:103-111.

Frédéric, B., Piel, Martin, H. (2017). Anemia falciforme. *IntraMed*. www.intramed.net

Ghosh (2015). Haemoglobinopathies in tribal populations of India. *Indian J Med Res.* 141(5): 505–508.

Haddad, A., Tyan, P., Radwan, A., Mallat, N., Taher, A. (2014). β -Thalassemia Intermedia: A Birds. Eye View. *Turkish Journal of Hematology*, 31 (1), 5 – 16.

Instituto Nacional de salud. *Drepanocitosis en Colombia: análisis de la notificación como enfermedad huérfana o rara al sistema de vigilancia en salud pública*, 2016 y 2017. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional, 1 (15 de enero 2018). [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/IQEN/IQEN %20vol %2023 %202018 %20num %201.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/IQEN/IQEN%20vol%2023%202018%20num%201.pdf)

Khosa, S. M. (2015). Comparative analysis of cellulose acetate hemoglobin electrophoresis and high-performance liquid chromatography for quantitative determination of hemoglobin A2. *Blood Res.* 50(1):46-50.

Kohne, E., (2011). Hemoglobinopathies - Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment. *Deutsches arzteblatt international*, (32):532-540.

Kuder, Lover, Lugo, Espinoza, Coccione (2014). Detección de hemoglobina S en neonatos del estado venezolano de Carabobo. *Medisan*, 8(18).

Massey, A. C., (2000). Microcytic anemia. Differential diagnosis and management of iron deficiency anemia. *Med Clin North Am*, 76(3):549-566.

Modell, Darlison (2008). Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. Boletín. *Organizacion Mundial de la Salud*. Report No: 6.

Mohammdai-Asl (2015). The Influence of Polymorphisms in Disease Severity in β -Thalassemia. *Biochem genet. Biochem*, (9-10):235-243.

Morales, C., (2017). *Diagnóstico diferencial de las hemoglobinopatías*. Sociedad Española de Medicina de Laboratorio.; 28:53-71. <http://www.seqc.es/download/tema/13/4413/469893008/2167177/cms/tema-5-diagnositco-diferencial-de-las-hemoglobionopatias.pdf/>

Old, J., (2016). Thalassaemias international federation. www.thalassaemia.org.cy/

Origa, R., (2018). Beta Beta-Thalassemia. En: Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., *et al.*, (Edits.). GeneReviews <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1426/>

Peng, C. T., Liu, S. C., Peng, Y. C., (2013). Distribution of thalassemias and associated hemoglobinopathies identified by prenatal diagnosis in Taiwan. *Blood Cells Mol Dis*. 51(3):138-141.

Risch, H. R., (2011). Review [Hemoglobinopathies--clinical symptoms and diagnosis of thalassemia and abnormal hemoglobins]. *Medline. Deutsches Ärzteblatt International*; 108(31-32): 532-40 16.

Rodak, B., (2014). *Hematología Fundamentos y aplicaciones clínicas*. Editorial Médica Panamericana.

Rosero, M. J., Bermúdez, A. J. (2012). Análisis de hemoglobinopatías en regiones afrocolombianas usando muestras de sangre seca de cordón umbilical. *Acta médica colombiana*. 37(3):118-124. <http://www.scielo.org.co/pdf/amc/v37n3/v37n3a03.pdf>

Satizábal, J., (2004). Incidencia de Hemoglobinopatías en Neonatos de Cali. *Salud Uninorte*. 2014:18: 71-72.

Schrier, S. L., (2002). Pathophysiology of thalassemia. *Current Opinion in Hematology*. 9(2):123-126.

Sillero, C., Belén, M., Sánchez, J., (2012). *Hemoglobinopatías y talasemias. diagnóstico por el laboratorio*. <https://docplayer.es/6177214-Hemoglobinopatias-y-talasemias-diagnostico-por-el-laboratorio.html>

Tarazi, I. S., Sirdah, M. M., E. I, Jead, H., A. I, Haddad, R. M., (2008). Does cigarette smoking affect the diagnostic reliability of hemoglobin $\alpha_2\delta_2$ (HbA2)? *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 22(2):119-122.

Tiwari, A. K., Chandola, I., (2009). Comparing prevalence of Iron Deficiency Anemia and Beta Thalassemia Trait in microcytic and non-microcytic blood donors: suggested algorithm for donor screening. *Asian J Transfus Sci*. 3(2):99-102.

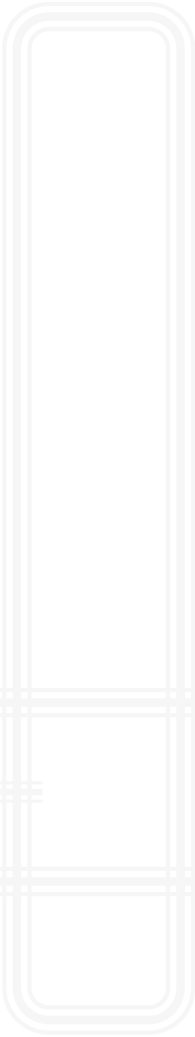
Usman, M., Moinuddin, M., Ghani, R., Usman, S., (2009). Screening of five common beta thalassemia mutations in the Pakistani population: a basis for prenatal diagnosis. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 9:305-310.

Usman, M., (2011). Role of iron deficiency anemia in the propagation of beta thalssemia gene. *Korean Jorunal or Hematology.*, 46(1): 41-44.

Verhovsek, M., So, CC., O'Shea, T., (2012). Is HbA2 level a reliable diagnostic measurement for beta-thalassemia trait in people with iron deficiency? *American Journal of Hematology.* 87(1):114-6.

Walter, E., Rodríguez, Romero., Germán, F., Sáenz, Renauld., y Mario, A., Chaves, Villalobos., (2017) Haplotipos de la Hemoglobina S. www.scielosp.org/article

Capítulo



Análisis físicoquímico y microbiológico de leche cruda en dos fincas lecheras de Colombia

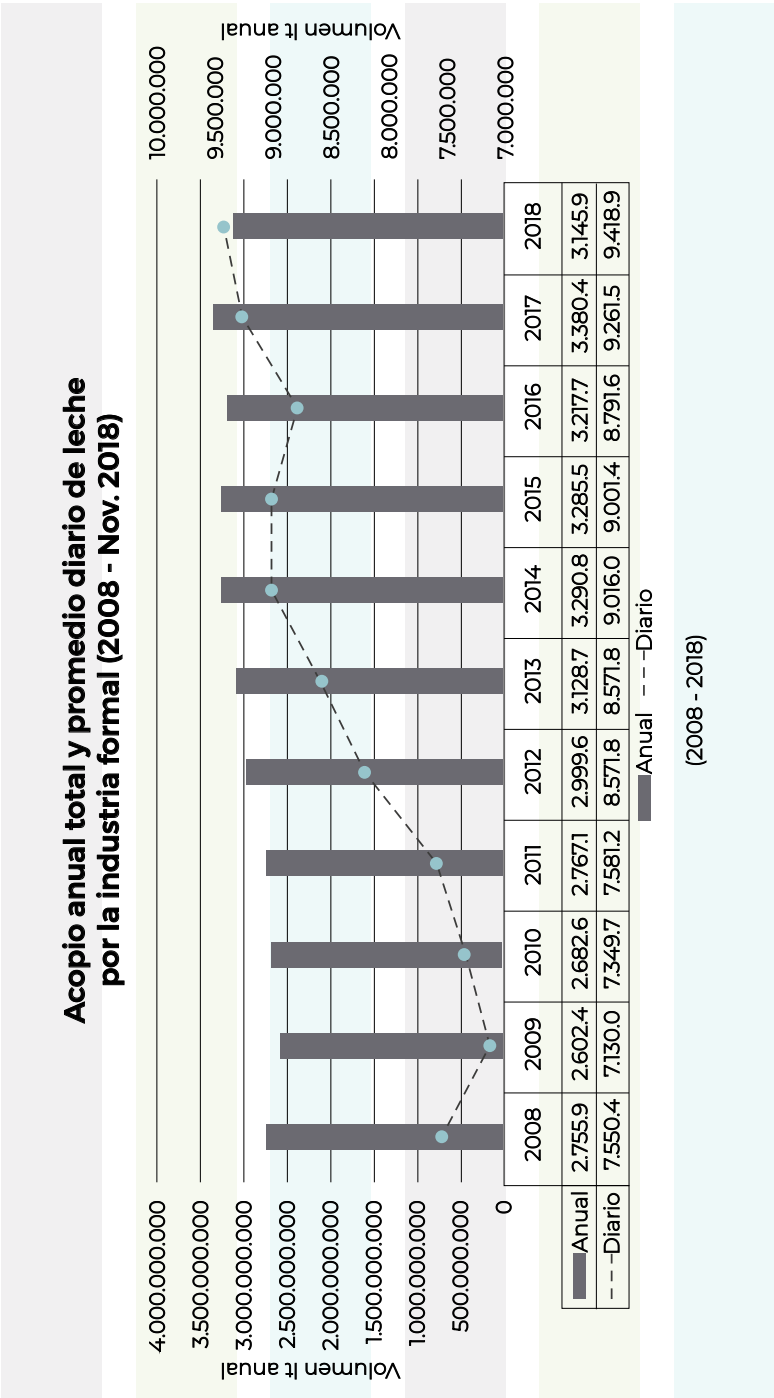
Claudia Lorena Cruz Hernández
Andrea Tatiana Durán-Rodríguez
Jeannette Navarrete Ospina
Gladys Pinilla Bermúdez
Liliana Constanza Muñoz Molina*

Introducción

La producción lechera es una de las principales actividades económicas en el sector agrario en Colombia, para el año 2018 se presentó un acopio total de 3.146 millones de litros de leche, lo que continúa posicionando al país como el cuarto productor en América Latina (figura 1). La leche es reconocida como producto esencial en la alimentación humana debido a su alto contenido nutricional, se requiere que esté libre de microorganismos, ya que es la materia prima de diferentes productos lácteos de consumo masivo. La cantidad de leche producida por un determinado animal depende de factores genéticos, historia nutricional, estado de lactación y buenas prácticas de manejo.

* Grupo de investigación REMA. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la Salud. Correspondencia: gpinillab@unicolmayor.edu.co/gpinillab@gmail.com

Figura 1. Acopio anual y promedio diario de leche en la industria formal bovina en Colombia. Disponible en: Asoleche. Fuente USP-MADR (2018).



Producción de leche en Colombia

En Colombia la industria bovina es nueve veces más grande que el área dedicada a la agricultura, aunque la productividad corresponde al 26 %, cuando se compara con el área de la agricultura que es del 63 %. El plan estratégico de la Federación Ganadera de Colombia (FEDEGAN) para el año 2019 incluyó optimizar la producción de leche, mediante el control de la mastitis bovina, la cual es una de las principales causas de pérdidas económicas considerables debido a que afecta tanto la composición como la productividad de la leche.

La producción lechera hace presencia en 22 departamentos del país, siendo Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Nariño los departamentos más destacados, los cuales cuentan con una buena ubicación geográfica, condiciones climáticas favorables y, además, han venido realizando un trabajo importante frente al manejo de forrajes resistentes a sequías. En el año 2016, en Colombia se registraron más de 395.215 unidades productoras de leche, es decir casi 400.000 fincas o haciendas de las cuales, solo el 20 % tienen más de 15 animales.

Características generales de las principales razas lecheras en Colombia

Las razas lecheras más frecuentes en Colombia son Holstein, Jersey y Normando. La raza Jersey es la más difundida a nivel nacional, tiene origen inglés, específicamente en la isla de Jersey, localizada en el Canal de La Mancha. A Colombia llegaron los primeros animales pertenecientes a esta raza, en 1946 importados por Miguel López Pumarejo. Debido a sus cualidades de rusticidad, tamaño, precocidad, facilidad de parto, longevidad y calidad de leche, es una raza que fácilmente se adapta al trópico. Esta raza se encuentra distribuida en regiones como la zona Cafetera, los Llanos Orientales, Valle del Cauca, Antioquia y Cundinamarca. El ganado de esta raza es pequeño y las vacas lecheras pesan en promedio entre 360 a 540 kg, no obstante,

es capaz de producir más leche por unidad de peso corporal que muchas otras razas.

En 1872 se introdujo la raza Holstein en Colombia por parte de Eustacio Santamaría, a cargo del gobierno del Estado de Cundinamarca. Esta raza ha prosperado extraordinariamente en Cundinamarca, Valle del Cauca, Boyacá, Antioquia y Nariño. El ganado Holstein tiene un peso promedio entre 350-650 kilos, con una alzada de 1.50 m, se caracteriza por su pelaje blanco y negro o blanco y rojo; características que les brinda una mayor adaptabilidad a climas cálidos. Esta raza tiene su primer parto antes de cumplir tres años y puede permanecer en un hato durante más de cinco lactancias. Los bovinos de esta raza pueden producir más de 25 litros de leche al día y debido al buen peso que pueden alcanzar llegan a producir leche con un contenido graso de 3.7 % y proteico de 3.15 %.

Por otra parte, la raza Normando, es procedente del cruzamiento entre los bovinos que poblaban la Normandía en el siglo IX y los animales traídos por los conquistadores vikingos, esto dio origen a las razas Contentine, Augeronne y Cauchoise, que al mezclarse entre sí dieron origen a la raza Normando actual, la cual es considerada una de las razas de doble propósito más importantes.

Los principales nichos de Normando en Colombia se encuentran en Cundinamarca, Boyacá y Caldas. Jorge Ruiz Forero, presidente de la Asociación Colombiana de Criadores de ganado Normando “Aso-normando” indicó que esta es una raza que se ha posicionado fuerte gracias a la calidad composicional de la leche, ya que actualmente en el país tiene un promedio de producción lechera que supera los 7000 litros por lactancia a 305 días y una buena composición nutricional de la leche con 4.35 % de grasa y 3.42 % de proteína; además de tener un buen equilibrio calcio-fósforo y la frecuencia de la variante β de la Kappa caseína es del 82 %, mientras que en otras razas como la Holstein esta variante se halla en un 11 %; todas estas cualidades permiten que la leche de esta raza tenga un rendimiento mayor de un 15 % al 30 % en la producción de quesos y mantequillas en comparación a otras razas.

Necesidades nutricionales de bovinos lecheros

La buena producción de leche depende de la buena alimentación y nutrición del animal, lo que se relaciona directamente con el background genético y la condición corporal. Actualmente se sabe que la producción de un bovino lechero puede depender de factores ambientales y fisiológicos y de las interacciones del animal con cada uno de estos factores (tabla 1). Las dietas para bovinos de alta producción lechera contienen alta concentración de energía que suelen provenir de fuentes de carbohidratos.

Tabla 1. Factores que afectan la producción lechera

Factores ambientales	Factores fisiológicos que afectan la lactancia
Periodo seco e intervalo de partos	Estado de lactancia
Condición corporal previa al parto	Persistencia de lactancia
Número e intervalo entre ordeños	Estado reproductivo y enfermedades y estrés
Temperatura ambiental	Edad del bovino y el tipo de raza

Fuente: elaboración propia.

Microbiota en leche cruda

La composición específica de la microbiota presente en la leche tiene un impacto directo en el desarrollo de diferentes productos lácteos; una alta carga microbiana puede provocar una fermentación más acelerada de la leche a través de la producción de lactato cau-

sando una variedad de impactos en las propiedades organolépticas y fisicoquímicas, reflejándose en pérdidas económicas importantes. Las bacterias que con mayor frecuencia se encuentran en la leche son las ácido lácticas; dentro de los géneros más comunes se tienen *Lactococcus* y *lactobacillus*.

Los microorganismos que se encuentran con mayor frecuencia en leches crudas son: *Enterococcus spp*, *Staphylococcus coagulasa negativa*, *Aerococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Acinetobacter spp*, *Bacillus spp*, *Enterobacter spp*, *Corynebacterium spp*, *Kocurias spp*, *Pseudomonas spp*, *Listeria spp*, *Salmonella spp*, y *Escherichia coli*. Sin embargo, existen microorganismos que están asociados al desarrollo de biopelículas y al establecimiento de enfermedades graves como la mastitis clínica que genera grandes pérdidas económicas estos microorganismos son principalmente *Escherichia coli*, *S. aureus* y *Streptococcus agalactiae*.

Diferentes variables geográficas, tales como temperatura, humedad, factores ambientales como la calidad del aire, del agua, de los pastos y, las condiciones climáticas, impactan sobre la producción diaria de la leche, al generar cambios en la morfología de la ubre y la microbiota de la glándula mamaria del bovino, que se reflejará en el aumento de la carga microbiana en la leche cruda. En algunos casos, los bovinos pueden estar cursando con mastitis subclínica, esta es una patología que se asocia con una disminución en la producción de la leche y variaciones en las características fisicoquímicas. Los microorganismos que con frecuencia se encuentran relacionados son los *Staphylococcus coagulasa negativos* (SCN) que forman parte de la microbiota normal del pezón y están presentes en las manos del ordeñador, lo que les facilita colonizar el canal del pezón y penetrar hasta los tejidos secretores del bovino, comportándose como microorganismos oportunistas.

Metodología

Tipo de estudio

Se realizó un estudio de tipo descriptivo experimental.

Muestras estudiadas

En 14 bovinos de 3 razas diferentes, Holstein, Jersey y Normando se obtuvieron 56 muestras de leche cruda pertenecientes a dos fincas lecheras en la vereda Vueltas Sector Mercadillo en Boyacá.

Identificación de factores de riesgo

Se entrevistó a los pequeños productores sobre la edad, producción de leche, raza, número de partos, número de abortos, tipo de alimentación, infecciones presentadas y tratamientos antimicrobianos. Además, se observó la práctica de ordeño y las características macroscópicas de las ubres.

Toma de la muestra

Se seleccionaron 14 bovinos y de cada cuarterón se recolectaron dos muestras de leche cruda del segundo ordeño del día una para el estudio microbiológico y la otra para el análisis fisicoquímico. Las muestras fueron transportadas a 4°C para su posterior análisis.

Determinación de factores físico-químicos de la leche

En la tabla 2 se pueden observar los métodos utilizados para la determinación de cada parámetro físico-químico. Estos parámetros se analizaron por bovino y no por cuarterón.

Tabla 2. Metodología empleada para el análisis de las propiedades fisicoquímicas

Propiedad fisicoquímica	Método
Densidad	Utilización del método 15/15 con Picnómetro.
Acidez	Utilización del reactivo fenoltaleína y titulación de la muestra con Hidróxido de sodio.
Grasa	Utilización del método de Gerber.
pH	Método potenciométrico a través del uso del Ph-metro.

Fuente: elaboración propia.

Aislamiento e identificación microbiana

Se realizó aislamiento de microorganismos en 56 muestras recolectadas, sembrando 20 μL de leche cruda en los medios de cultivo MacConkey, BHI y Bilis esculina y luego se incubaron 24 horas a 37°C. A las muestras que presentaron crecimiento bacteriano se les realizó la identificación microbiana con el sistema VITEK2 de Biomeriux.

Determinación del número más probable (NMP) en las muestras de leche

1 ml de cada muestra se inoculó en 9 ml de caldo lactosado bilis verde brillante al 2 %. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en base 10, por triplicado. Se incubaron a 37°C por 48 horas y se realizaron lecturas cada 24 horas para observar la producción de gas. Los tubos con presencia de gas fueron repicados en caldo triptófano para determinar la presencia de coliformes fecales y en placas de agar MacConkey.

Prueba de la reductasa

En tubos estériles se agregó 10 mL de leche a los que se añadió 1 mL de la solución indicadora de azul de metileno y se incubaron a 37°C, posteriormente se leyó el viraje de color de las muestras cada 15 minutos durante 5 horas.

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a Gentamicina

La evaluación in vitro de la susceptibilidad bacteriana se determinó mediante la técnica de dilución en agar con Gentamicina, aminoglucósido de amplio espectro. Controles: para que la técnica fuera válida se contó con dos controles las cepas ATCC 12228 y la ATCC 29213 de *S. aureus*.

Procedimiento

1. Se preparó una solución stock o solución de trabajo inicial con una concentración de 5.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pesando el principio activo del antibiótico, teniendo en cuenta su potencia dada por el fabricante $\mu\text{g}/\text{mg}$. Según el CLSI los microorganismos obtenidos en el presente estudio tienen un rango de susceptibilidad de 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se debe realizar el siguiente cálculo para saber cuántos mg del antibiótico (ATB) se deben pesar:

Peso (mg del ATB) =

$$\frac{\text{Volumen deseado SLN stock (mL)} \times \text{concentración final}}{\text{Potencia ATB (dada por el fabricante) } \mu\text{g}/\text{mg}}$$

2. Preparación de las diluciones seriadas del antibiótico: se prepararon diluciones seriadas en base dos desde 2560 hasta 0.62, para alcanzar las concentraciones de 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como se muestra en la tabla 3.

3. Preparación del medio de cultivo: según indicaciones del CLSI, el medio de ideal para pruebas de susceptibilidad es el Mueller Hinton; al que se le incorpora cada una de las diluciones del antibiótico.
4. Preparación del inóculo: se emplearon cultivos de 18 a 24 horas. Se resuspendieron de 2 a 4 colonias del microorganismo en un tubo con 5 ML de solución salina estéril isotónico al 0.89 %. Se ajustó cada una de las suspensiones a una densidad óptica de 0.09-0.1, equivalente a la escala 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC/ML), usando una longitud de onda de 625 nm.

Tabla 3. Diluciones seriadas del antibiótico

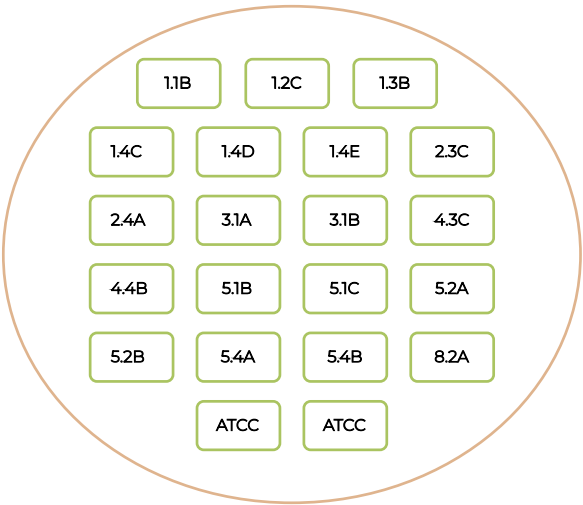
Concentración		
Tubo	$\mu\text{g/ml}$	Dilución
1	128	2560
2	64	1280
3	32	640
4	16	320
5	8	160
6	4	80
7	2	40
8	1	20
9	0.5	10
10	0.25	5
11	0.125	2.5
12	0.06	1.25
13	0.03	0.62

Fuente: elaboración propia.

De las suspensiones estandarizadas se tomaron 50 μ L y se mezclan en 5 mL de solución salina estéril. Los inóculos se utilizaron dentro de los 15 minutos siguientes y se almacenaron en hielo para evitar la alteración de la escala.

- 5. Inoculación de las cajas de Petri: antes de iniciar la inoculación se etiquetó cada caja de Petri con las siglas del antibiótico, su concentración y la fecha. Se creó una plantilla para la siembra de la dilución final de cada microorganismo. Se homogenizó cada una de las diluciones por medio de vórtex y se fue añadiendo 10 μ l de cada uno de los microorganismos al agar siguiendo la plantilla. Las placas permanecieron a temperatura ambiente para la adecuada absorción de cada inóculo. Se incubaron las placas durante 18 a 24 horas a 36°C. Se realizó una caja de agar sin antibiótico como control de crecimiento de los microorganismos (Figura 2).

Figura 2. Montaje en el ensayo antimicrobiano.



Trabajo en conjunto con la comunidad: fueron ejecutadas tres intervenciones con la comunidad en donde se llevó a cabo el estudio, se dieron capacitaciones acerca del mejoramiento de buenas prácticas de ordeño, diferentes requerimientos nutricionales como los fo-

rrajes y se sugirió la implementación de un plan integral, junto con la alcaldía, en pro de la calidad de la leche y la salud animal.

Resultados

Identificación de factores de riesgo

Se realizó el análisis en 6 bovinos (43 %) que pertenecieron a la raza Holstein, 6 (43 %) a Jersey y, 2 (14 %) a Normando. El rango de edad en los bovinos fue de 2 a 8 años (tabla 4).

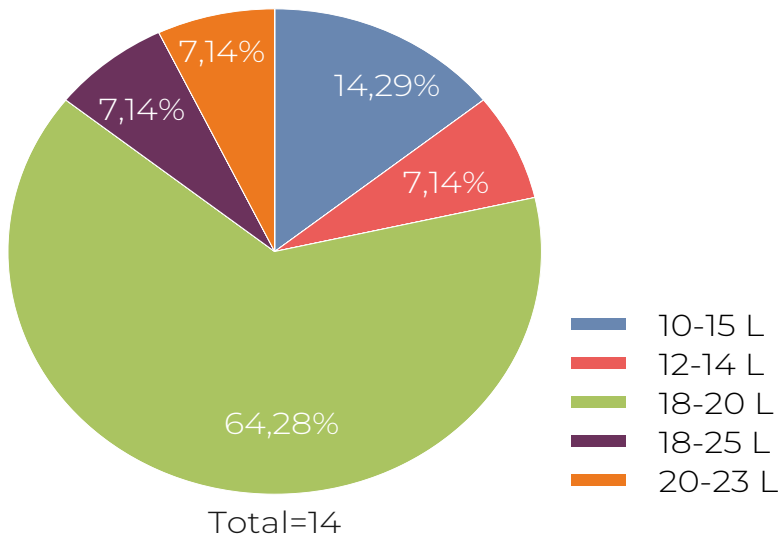
Tabla 4. Identificación de factores de riesgo asociados a mastitis

Número de animales	Raza	Edad	Alimentación	Número de partos	Número de abortos
6	Jersey	2-8 años	Pasto, purina y sal.	1-6	0
6	Holstein	2-6 años	Pasto, purina y sal.	1-3	1
2	Normando	1-8 años	Pasto, purina y sal.	1-8	0

Fuente: elaboración propia.

El 64,28 % de bovinos evaluados tuvieron un promedio de producción de leche de 18 ± 20 litros diarios (figura 3), la producción por bovino fue de 18 ± 20 litros diarios para las razas Jersey/Holstein y de 10 ± 15 litros diarios para la raza Normando. El 92.8 % de los bovinos tenían al menos un parto, un bovino de raza Holstein presentó un aborto espontáneo; la nutrición consistía de purina, pasto y sal, suministrada 2 veces al día, al examen físico ninguno de los bovinos mostró signos de infección y ni consumo de antibióticos.

Figura 3. Porcentaje de bovinos según el promedio de litros (L) de leche por día.



Determinación de factores físico-químicos de la leche cruda

Se evaluaron los resultados para cada factor fisicoquímico según los valores establecidos por el decreto 616 del 2006. Para la acidez los valores normales oscilan entre 0.13 a 0.21 %m/v, para el pH de 6,6 a 6,8. Los porcentajes de grasa se manejan desde 3.0 %, aunque la leche de la raza Jersey genéticamente tiene un mayor porcentaje de proteínas y de fosfatos por lo que los niveles de grasa se manejan de 3,4 % a 5.3 % y densidades de 1.030-1.033g/ml. El porcentaje de grasa se observó disminuido en las tres razas, la raza Holstein presentó un promedio general de 2,87 %, la raza Jersey de 3,03 % y la raza Normando de 3.15 %. La densidad se encontró aumentada en las tres razas, únicamente un bovino de raza Jersey presenta un valor normal de 1.030g/ml, los parámetros de la acidez y el pH fueron normales en las leches crudas (tabla 5).

Tabla 5. Análisis fisicoquímicos de la leche cruda por bovino

N° de Bovino	Densidad V.R: 1.030-1.033 g/ml	% Grasa V.R: 3.4-5.3 %	Ph V.R: 6.7-6.8	Acidez V.R: 0.13-0.21 % m/v
1	1.030 g/ml	3.1%	6.7	0.18% m/v
2	1.038 g/ml	3.0%	6.8	0.16% m/v
3	1.042 g/ml	3.2%	6.8	0.20% m/v
4	1.046 g/ml	3.2%	6.8	0.17% m/v
5	1.046 g/ml	2.9%	6.8	0.17% m/v
6	1.039 g/ml	3.0%	6.7	0.21% m/v
7	1.038 g/ml	2.5%	6.7	0.20% m/v
8	1.046 g/ml	3.1%	6.7	0.21% m/v
9	1.043 g/ml	2.9%	6.8	0.13% m/v
10	1.034 g/ml	3.0%	6.8	0.15% m/v
11	1.046 g/ml	3.1%	6.7	0.14% m/v
12	1.039 g/ml	2.9%	6.7	0.14% m/v
13	1.039 g/ml	2.9%	6.7	0.14% m/v
14	1.046 g/ml	3.0%	6.8	0.14% m/v

Fuente: elaboración propia.

Aislamiento e identificación microbiana en las muestras de leche cruda

Se obtuvieron 41 aislamientos de las 56 muestras analizadas, 27(69.2 %) cepas correspondieron a *Staphylococcus coagulasa* negativa, de los cuales 12 (29.3 %) cepas fueron *Staphylococcus epidermidis*; 1 (2.4 %) cepa de *Staphylococcus aureus*, 1 (2.4 %) cepa de *Streptococ-*

cus agalactiae, 8 (21 %) de los aislamientos pertenecieron a otros cocos Gram positivos y, 4 fueron bacilos Gram negativos (10 %) los cuales pertenecen a cepas de *Serratias liquefaciens* (Figuras 4 y 5).

Figura 4. Proporción de los aislamientos microbianos en leche cruda según el tipo de microorganismo.

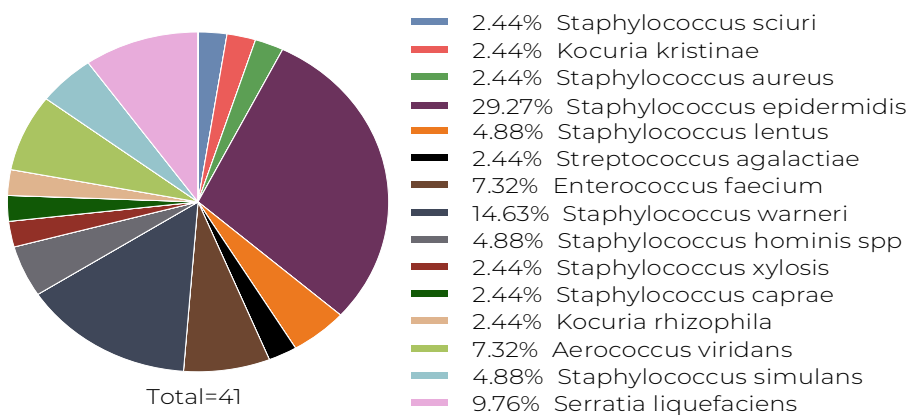
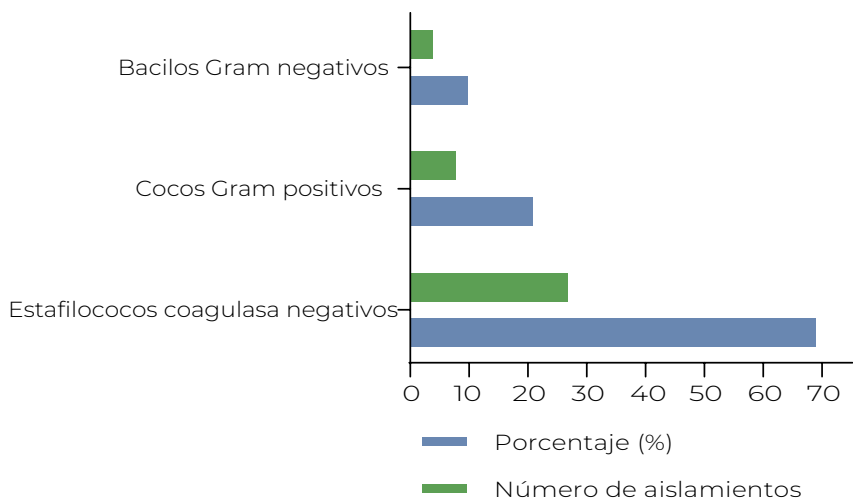
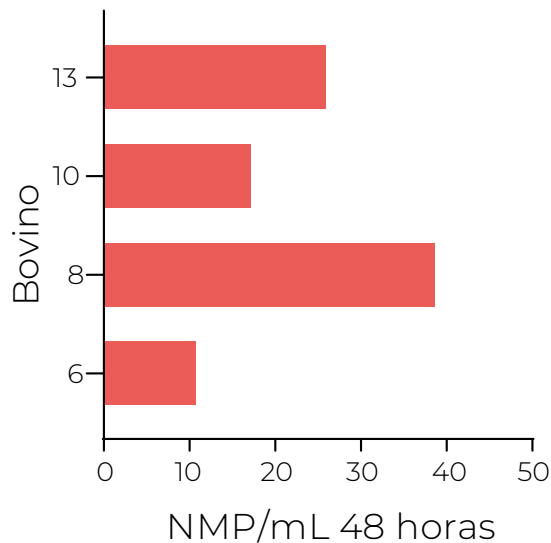


Figura 5. Proporción de los aislamientos microbianos obtenidos en las muestras de leche cruda según la cepa aislada.

Determinación del NMP en las muestras de leche

En las muestras de los bovinos 6, 8, 10 y 13 se observó producción de gas. La técnica se realizó por cada uno de los cuatro cuarterones de cada bovino. Los coliformes totales oscilaron entre 10,9 NMP/m a 38,7 NMP/m y se descartó la presencia de coliformes fecales. Los resultados indicaron que el bovino número 8 presentó la mayor carga de bacterias contaminantes en la leche (figura 6).

Figura 6. Determinación de la técnica del NMP en las muestras de leche analizadas.



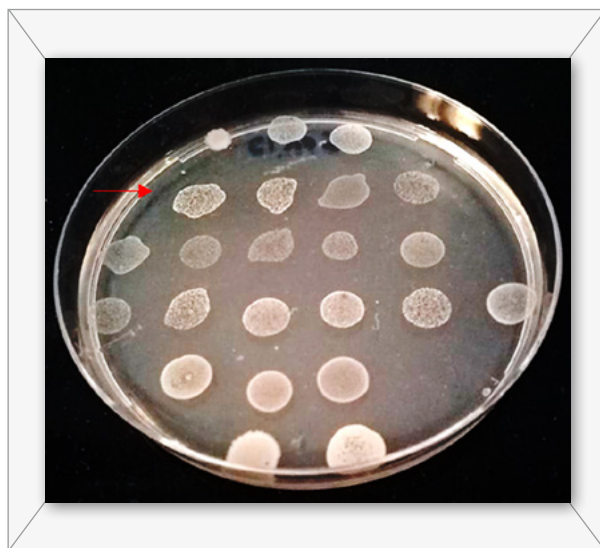
Prueba de la reductasa

No se observó degradación total de la solución indicadora azul de metileno en ninguna muestra; esto muestra que se tiene un número estimado de 100.000 UFC/mL a 200.000 UFC/mL, es decir un recuento normal de microorganismos en leches crudas.

Pruebas de susceptibilidad a gentamicina antimicrobiana

Teniendo en cuenta los parámetros establecidos por el CLSI que dictan que los géneros aislados son sensibles $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ de Gentamicina, intermedios = $8 \mu\text{g/ml}$ y resistentes $\geq 16 \mu\text{g/ml}$. La mayor concentración en la que se tuvo crecimiento fue a $1 \mu\text{g/ml}$ indicando que son aislamientos sensibles a la Gentamicina (figura 7).

Figura 7. Crecimiento de los aislamientos bacterianos a una concentración de $0.03 \mu\text{g/ml}$ de gentamicina.



Trabajo con la comunidad

Durante las intervenciones, se planteó como objetivo principal con la comunidad, mejorar la cantidad y la calidad de la leche producida por bovinos en el municipio de Caldas-Boyacá, por lo que hacia futuro se busca, junto con la alcaldía, fortalecer la normatividad para la gestión de proyectos y la creación de una posible asociación. La principal finalidad del grupo de investigación REMA fue concienti-

zar a los pequeños productores de la importancia de una ganadería responsable y de la implementación de buenas practicas de ordeño reflejadas en una buena calidad microbiologica de la leche aun sin pasteurizar (figura 8).

Se observó detalladamente todo el proceso de ordeño para identificar diferentes puntos criticos que pudiesen afectar la calidad de la leche, después de esta etapa de reconocimiento y teniendo los resultados fisicoquímicos y microbiológicos de cada bovino se realizó una intervención con la comunidad sobre las buenas prácticas de ordeño resaltando un buen lavado de manos antes y después del ordeño, se escucharon las inquietudes de la comunidad sobre el manejo de las mastitis y otras enfermedades comunes que afectan al ganado y por ultimo se resaltó la gran labor que hacen los pequeños productores y tomaron medidas correctivas con el fin de agilizar el proceso de ordeño pero sin perder la calidad de la leche (figura 8).

Figura 8. Evidencia de las jornadas que se llevaron a cabo en las fincas del municipio de Caldas Boyacá.



Discusión

En los animales existen diferentes factores de riesgo que predisponen al desarrollo de patologías como la mastitis subclínica, entre ellos: la edad, en la que la prevalencia de la enfermedad incrementa conforme mayor sea el bovino, en el presente estudio los bovinos con mayor edad pertenecieron a las razas Jersey y Normando, interesantemente los animales pertenecientes a la raza Normando presentaron una menor producción de leche.

Respecto al análisis fisicoquímico se observó disminución en los porcentajes de grasa, especialmente en la raza Holstein con una diferencia de 0,5 % por debajo del valor normal y la Jersey con una diferencia de 0,6 %, las densidades de las tres razas de bovinos estaban altas, esto coincide con lo mencionado por Calderón *et al.* (2006), al demostrar que los valores de grasa por debajo del 3,0 %, constituyen una leche de mala calidad nutricional y perjudicial para los productores especialmente en el valor económico de la leche. La grasa puede verse modificada por el tipo de raza, la concentración de fibra, relación forraje/concentrado, la capacidad metabólica de cada bovino, la edad del animal y el tipo de ordeño. Se ha propuesto que para aumentar estos porcentajes de grasa se debe ofrecer heno o pasto verde antes de suministrar un concentrado proteico, varias veces al día (Calderon, *et al.* , 2006). Por otro lado, Bramley *et al.* (1996), señalan que la mastitis clínica y subclínica causan una disminución porcentual de grasa en la leche.

La densidad es un parámetro que está directamente relacionado con la grasa, sólidos no grasos y el agua que contenga la leche, diversos estudios concuerdan con los resultados obtenidos al señalar que el aumento de la densidad indica leches con muy bajas concentraciones de grasa, proteína y energía (Calderon, *et al.* 2007; Gentillini, *et al.* 1995). En cuanto al pH valores superiores en la leche se presentan en leches mastíticas, mientras que valores inferiores indican presencia de calostro o descomposición bacteriana (Brito, 1995). Los 14 bovinos presentaron pH dentro del rango normal lo que podría descartar la presencia de estas condiciones.

La mayoría de los microorganismos aislados fueron *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) con un porcentaje del 69.2 %, estos resultados pueden dar indicio de posible predisposición a mastitis subclínica en los bovinos evaluados pues varios autores señalan que estos microorganismos son la principal causa de esta patología; *S. sciuri* y *S. xylois* son las especies aisladas con mayor frecuencia en leches de bovinos que presentan signos clínicos, mientras que *S. lentus* es menos frecuente y por lo general se ha hallado en material de ordeño (Kleinschroth, et al. 1990).

S. epidermis y *S. Warneri* causan mayores tasas de mastitis subclínica de difícil tratamiento en bovinos primo lactantes y de más de 4 partos (De Visscher, et al. 2017; Fry, et al. 2014). A partir de las muestras de leche evaluadas se aisló *S. aureus* y *S. agalactiae*, hallazgo importante debido a que estos microorganismos son los principales agentes etiológicos de mastitis clínicas, los cuales causan daños serios en el tejido mamario del bovino y presentan mayor virulencia lo que les facilita una rápida propagación.

La normatividad Colombiana no establece el recuento de coliformes totales y fecales como criterio para evaluar la calidad microbiológica de la leche; sin embargo, una alta carga de bacterias contaminantes disminuye la vida útil de los productos elaborados y están indicando el grado de contaminación fecal y la limpieza de las manos de los operarios (Cervinkova, et al. 2013). Según Rodríguez et al. (2014), lo ideal es mantener cifras menores de 50 NMP/ml que se logra implementando un adecuado sellado y el secado rutinario de los pezones (Rodríguez, et al. 2015), este hallazgo evidencia que es necesario implementar este tipo de medidas en los hatos para disminuir la carga de bacterias contaminantes, debido a que se encontró un número elevado de estos microorganismos. Un microorganismo que ha sido implicado en el desarrollo de mastitis de tipo ambiental es la *Serratia liquefaciens*, ya que generalmente infecta al bovino porque se encuentra en estiércol, material de cama, agua contaminada, etc. Las infecciones causadas por este microorganismo pueden ocurrir tanto en el periodo seco como de lactancia de los bovinos (Todhunter, 1991).

Los resultados evidenciaron variedad de microbiota en las muestras de leche cruda recolectadas, lo que es de gran interés debido a

que una exposición prolongada a este tipo de microorganismos aumenta el riesgo de desarrollo de mastitis clínica, subclínica y ambiental, por lo que toma gran relevancia implementar medidas de control que promuevan y garanticen la calidad higiénica de la leche y el bienestar de los bovinos. Para una mayor calidad en la leche se debe reducir la diversidad microbiana, por lo que es necesario concientizar y capacitar a las personas encargadas acerca de las buenas prácticas de ordeño que deben aplicar antes, durante y después de la obtención de la leche.

Referencias bibliográficas

Aka, S.T. (2015). Killing efficacy and anti-biofilm activity of synthetic human cationic antimicrobial peptide cathelicidin hCAP-18/LL37 against urinary tract pathogens. *J Microbiol Infect Dis*, 5(1):15–20.

Asoleche. (1996). *Leche en cifras*. <https://asoleche.org/leche-en-cifras/>

Bramley, A. J., et al. (1996). Current concepts of bovine mastitis. National Mastitis Council.

Boman, H. G. (1995). Peptide Antibiotics and their Role in Innate Immunity. *Annu Rev Immunol*, 13(1):61–92.

Brito, M. A. V. P. (1995). Conceitos basicos da qualidade da leite. En Brito JRF, Dias JC. *Sanidade do gado leiteiro*. MBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (Coronel Pacheco, MG) Tortuga, 55-62.

Chavhan, S. K., D. R. Kalorey, A. A. Nagdive, H. J. Purohit, S. B. Barbudhe, and N. V. Kurkure. (2011). Molecular characterization of inter-cellular adhesion gene in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk. *Trop. Anim. Health Prod*, 44:247–252.

Cai, J., Wang, D., & Liu, J. (2017). Regulation of fluid flow through the mammary gland of dairy cows and its effect on milk production: a systematic review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1261–1270.

Calderón A., *et al.* (2007). Evaluación de la calidad composicional de leches en cuatro procesadoras de quesos en el municipio de Montería, Colombia. *Rev MVZ Córdoba*, 12, 912-920.

Claderón, A., García, F., y Martínez, G. (2006). Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. *Rev. MVZ Córdoba*, 11,175-737.

Calderón, A., Rodríguez, V., *et al.* (2008). Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Rev. Colombiana de ciencias pecuarias*, 21:582-589.

Cervinkova, D., Vlkova, H., Borodacova, I., *et al.* (2013). Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. *Veterinarni Medicina*, 58: 567–575.

Chavhan, S. K., D. R. Kalorey, A. A. Nagdive, H. J. Purohit, S. B. Barbuddhe, and N. V. Kurkure. (2011). Molecular characterization of inter-cellular adhesion gene in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk. *Trop. Anim. Health Prod*, 44:247–252.

Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., *et al.* (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*, 22(6):996–1006.

De la Fuente Nuñez, C., Reffuveille, F., Haney, E. F., Straus, S. K., Hancock, R. E. W. (2014). Broad-Spectrum Anti-biofilm Peptide That Targets a Cellular Stress Response. *PLoS Pathog*, 10(5).

De Visscher, A., S. Piepers, F. Haesebrouck, K. Supré, and S. De Vliegher. (2017). Coagulase-negative *Staphylococcus* species in bulk milk: Prevalence, distribution, and associated subgroup and species-specific risk factors. *J. Dairy Sci*, 100,629–642.

De Visscher, A., S. Piepers, K. Supré, F. Haesebrouck, and S. De Vliegher. (2015). Short communication: Species group-specific predictors at the cow and quarter level for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in dairy cattle throughout lactation. *J. Dairy Sci*, 98 (1): 5448–5453.

Fabisiak, A., Murawska, N., Fichna, J. (2016). LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity. *Pharmacol Reports*, 68(4):802–8.

FEDEGAN. (2019). Plan estratégico de la ganadería colombiana. Federación Nacional de Ganaderos, Fondo Nacional del Ganado.

Fry, P, et al. (2014). Association of coagulase-negative staphylococcal species, mammary quarter milk somatic cell count, and persistence of intramammary infection in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 97:4876– 4885.

Gentilini, E., Denamile, G., Godaly, M. S. (1995). Mastitis bovina: Tipificación del género *Staphylococcus*. *Vet Arg*, 12:384-386.

Gunn, K. M., Holly, M. A., Veith, T. L., Buda, A. R., Prasad, R., Rotz, C. A., Soder, K. J., Stoner, A. M. K. (2019). Projected heat stress challenges and abatement opportunities for U.S milk production. *Plos one*, 28; 14(3).

Hell, E., Giske, C.G., Nelson, A. (2010). Human cathelicidin peptide LL37 inhibits both attachment capability and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Lett Appl Microbiol*, 50(2):211-5.

Kleinschroth, E., Rabvolñd, K., Deneke, J. (1990). La Mastitis, diagnóstico, prevención y tratamiento. Ediciones médicas.

Klibi, A., Jouini, A., Gómez, P., Slimene, K., Ceballos, S., Torres, C., & Maaroufi, A. (2018). Molecular Characterization and Clonal Diversity of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* Isolates of Milk of Cows with Clinical Mastitis in Tunisia. *Microbial Drug Resistance*, doi:10.1089/mdr.2017.0278.

Kusaka, S., Nishida, A., Takahashi, K., et al. (2017). Expression of human cathelicidin peptide LL-37 in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*, 191(1):96–106.

Lin, Q., Deslouches, B., Montelaro, R. C., Di, Y. P. (2018). Prevention of ESKAPE pathogen biofilm formation by antimicrobial peptides WLBU2 and LL37. *J Antimicrob Agents*, 52(5) 667-6672.

López E, Lancheros A, Mora C, Cifuentes P. (2018). *Guía de Microbiología industrial aplicada a la producción industrial*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Machado, S. G., Baglinière, F., Marchand, S., et al. (2017). The Biodiversity of the Microbiota Producing Heat-Resistant Enzymes Responsible for Spoilage in Processed Bovine Milk and Dairy Products. *Front Microbiol*, 8:302.

Machado, S, et al. (2015). *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as predominant spoilers in Brazilian cold raw milk. *Journal of Food Science*, 80:1842–1849.

Marques, V. F., Motta, C. C., Soares, B. D., et al. (2016). Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Braz J Microbiol*, 48(1):118–124.

Ministerio de Protección Social de Colombia. (2006). Decreto 616. Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendia, importe o exporte en el país.

National Mastitis Council (1999). *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. NMC.

Naushad, S., Naqvi, S. A., Nobrega, D, et al. (2019). Comprehensive Virulence Gene Profiling of Bovine Non-aureus *Staphylococci* Based on Whole-Genome Sequencing Data. *mSystems*, 4(2):e00098-18.

Pang, M., Sun, L., He, T., et al. (2017). Molecular and virulence characterization of highly prevalent *Streptococcus agalactiae* circulated in bovine dairy herds. *Vet Res*, 48(1):65.

Pang, M, et al. (2018). Insights Into the Bovine Milk Microbiota in Dairy Farms With Different Incidence Rates of Subclinical Mastitis. *Frontiers in microbiology*, 9.

Pinto, A. (2017). Sector lechero en Colombia: potencial desperdiciado. Universidad de Los Andes. <https://aneia.uniandes.edu.co/2017/09/sector-lechero-en-colombia-potencial-desperdiciado/>

Quigley, L., et al. (2013) The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev*, Sep; 37(5):664986.

Ramírez, N., Arroyave, O., et al. (2011). Factores asociados a mastitis en vacas de la microcuenca lechera del altiplano norte de Antioquia, Colombia. *Rev. Med.Vet*, 22: 31- 42.

Randal, F. (2000). *Eckert-Fisiología Animal*. Editorial Guanabara Koogan.

Reyes, G., Molina, B. y Coca, R. (2010). *Calidad de la leche cruda*. Primer foro sobre ganadería lechera de la zona alta de Veracruz.

Rodríguez, V., Calderón, A., et al. (2015). Calidad de leches crudas en empresas ganaderas doble propósito en el departamento de Córdoba (Colombia) en condiciones de máxima precipitación. *Rev veterinaria y zootecnia*, 8:2-10.

Ruiz. J. (2006). Evaluación de la producción y calidad de la leche en vacas Holstein de primer parto suplementadas con Ensilaje de

papa. [Trabajo de grado para optar al título de zootecnista]. Universidad de La Salle.

Ruiz, R. (2015). *Mastitis bacteriana en ganado bovino: etiología y técnicas de diagnóstico en el laboratorio*. http://www.ammveb.net/articulos/Mastitis_bacteriana.pdf

Spreer, E. (1991). Lactología industrial. Acribia.

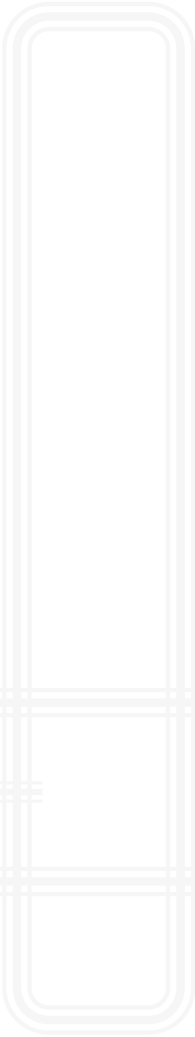
Todhunter, D. A., K. L. Smith, and J. S. Hogan. (1991) *Serratia* species isolated from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 74:1860-1865.

Vacheyrou, M., Normand, A-C, Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R. & Bouton, Y. (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int J Food Microbial.* 146: 253-262.

Xu, W., Vervoort, J., Saccenti, E., van Hoeij, R., Kemp, B., van Knegsel, A. (2018). Milk Metabolomics Data Reveal the Energy Balance of Individual Dairy Cows in Early Lactation. *Sci Rep*, 8(1):15828.

Zambrano, J., Grass, J. (2008). Valoración de la calidad higiénica de la leche cruda en la asociación de productores de leche de Sotará- Asproleso, mediante las pruebas indirectas de resazurina y azul de metileno. *Rev Unicauca*, 6: 54-66.

Capítulo



Polimorfismos en los receptores tipo toll y susceptibilidad a presentar espondiloartropatías asociado con la infección por *Chlamydia trachomatis**

Ruth Mélida Sánchez Mora**

Dayana Rodríguez Morales***

Gabriela Arévalo Pinzón****

Introducción

Los Toll-like receptor (TLRs), son receptores que pertenecen a la respuesta inmune innata y representan gran importancia en la primera línea de defensa contra patógenos. Poseen repeticiones ricas en leucina presentes en el dominio extracelular que son fundamentales para el reconocimiento de los PAMPs, igualmente presentan un dominio intracelular de gran importancia en la activación de la vía de

* Nombre del proyecto: Artritis reactiva (ARe) asociada a un SNP del Toll Like Receptor TLR2 en pacientes diagnosticados con ***Chlamydia trachomatis***. Grupo Biotecnología y Genética UCMC.

** PhD Biotecnología. U. Nacional de Colombia. Docente Investigadora Grupo Biotecnología y Genética UCMC. Docente de Planta, rmsanchezm@unicolmayor.edu.co

*** Estudiante Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Grupo Biotecnología y Genética UCMC, drodriguezr@unicolmayor.edu.co

**** Gabriela Arévalo Pinzón. PhD Ciencias Biológicas y Biomédicas. Universidad del Rosario. Docente. Docente Maestría en microbiología. garevalop@unicolmayor.edu.co

señalización. En los humanos se han identificado 11 TLRs, los cuales se dividen en dos categorías, según el patógeno que reconoce, bacterianos (TLRs de PAMPs 4 y 5) o virales (TLR3, 7/8 y 9), los cuales se encuentran en la superficie celular. El gen TLR4 se encuentra presente en células como los macrófagos circulantes y otras células inmunes sistémicas. El TNF α tiene la capacidad de aumentar la expresión del gen TLR4 por medio de su receptor iniciando una cascada de señalización (Medzhitov, 2001).

Del conjunto de los Toll like receptor (TLRs) descritos en la literatura, el TLR4 y TLR2 tienen un papel clave en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de bacterias Gram positivas y Gram negativas, tales como lípidos (LPS), peptidoglicanos, porinas, lipoproteínas y ácido lipoteicoico; por esta razón, estudiar el papel que desempeña los TLRs asociado con *C. trachomatis* y ARe aportaría al esclarecimiento de la etiología de la enfermedad.

Estudios previos han reportado asociación del Polimorfismo de nucleótido simple (SNP), relacionados con artritis reactiva aguda, pudiendo llegar a ser crónica (Tsui *et al.*, 2008). Se han reportado estudios de asociación entre el SNP y la infección con *Salmonella enteritidis* en pacientes con ARe; sin embargo, no se conocen estudios de la asociación entre algunos SNP y el desarrollo de ARe en pacientes sensibilizados a *C. trachomatis*.

El papel de la genética en el estudio de las enfermedades complejas crónicas e infecciosas

Los estudios de ligamiento y de genes candidatos, han permitido identificar múltiples regiones cromosómicas y polimorfismos relacionados con la susceptibilidad de asma, atopia, entre otras enfermedades complejas como las espondiloartropatías (Sengler *et al.*, 2002) en estos estudios, se han reportado genes que participan en la inmunidad innata y modulan la respuesta a agentes microbianos, los cuales han adquirido reciente importancia en el entendimiento de la

atopia, como una rasgo complejo en la cual intervienen interacciones gen a gen y gen ambiente, este es solo un ejemplo de las múltiples enfermedades complejas, en las cuales polimorfismos presentes en genes involucrados en la inmunidad innata, estaría asociados en la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades crónicas infecciosas y no infecciosas.



Estudios de genomas completo

En la actualidad las grandes tecnologías en secuenciación permiten buscar variantes comunes a través del genoma, llevando a cabo la genotipificación de más de 300.000 SNPs (Polimorfismo de nucleótido único), estudios conocidos como Genome Wide. Otros estudios de mapeo fino están enfocados en regiones candidatas que han sido identificadas previamente por estudios de desequilibrio de ligamiento y pueden contener entre 5 y 50 genes y, pueden involucrar varios cientos de SNPs.

Sin embargo, otro tipo de estudios genéticos de menor tamaño son útiles para la evaluación de asociaciones entre marcadores en un locus y el fenotipo o rasgo de estudio, entre estos están los estudios de genes candidatos, que involucran 5-50 SNPs, en genes definidos, que se encuentran en posiciones postulantes identificadas en previos estudios de ligamiento, y el estudio de polimorfismos candidatos, en los cuales se evalúan polimorfismos sospechosos de estar implicados en un rasgo (Balding, 2006).

La hipótesis de enfermedades comunes / variables comunes propone que cada factor genético es en gran parte responsable de la susceptibilidad genética a una enfermedad compleja. En los estudios de asociación en los cuales se han identificado polimorfismos asociados de susceptibilidad, estos probablemente no son responsables directos de la susceptibilidad a la enfermedad, pero podrían estar en desequilibrio de ligamiento con la verdadera variable funcional, dichas variables de susceptibilidad se pueden encontrar en segmentos cromosómicos ancestrales compartidos entre todos los sujetos afectados con determinada enfermedad compleja.

Gracias a los resultados del Proyecto Genoma Humano, en el cual se caracterizó la secuencia completa del ADN humano, se identifica-

ron variantes genéticas que contribuyen a la individualidad genética y los hallazgos del proyecto HapMap (mapa de haplotipos), cuyo objetivo es la caracterización de la diversidad genética en diferentes grupos poblacionales, han permitido que los estudios de la genética en enfermedades complejas adquirieran un nuevo enfoque, desde la caracterización de polimorfismos en un gen candidato como posible responsable de susceptibilidad a determinada enfermedad, para incluir varios factores de riesgo genéticos y no genéticos.



Nuevos enfoques desde la genética

Actualmente se observan diversos estudios en el contexto de enfermedades genéticas complejas: la evaluación de genes candidatos, estudios de ligamiento de genoma completo y, estudio de asociación de genoma completo, entre otros (Steinke *et al.*, 2008).

El estudio de genes candidatos se enfoca en los que pueden estar participando en una vía de la enfermedad y la presencia de un polimorfismo funcional, en el cual se pueda evaluar la asociación con determinada enfermedad en la población, para este tipo de estudios se evalúan grupos de casos y controles, para probar la asociación entre la variante funcional y la susceptibilidad a la enfermedad, o en un grupo familiar y probar la vinculación del polimorfismo con la susceptibilidad a la enfermedad (Steinke *et al.*, 2008).

El papel de un polimorfismo debe confirmarse en un estudio funcional, debido a que con gran frecuencia, estos son silenciosos y no tienen efecto en la expresión del gen y es posible que la asociación previa observada se deba a otro polimorfismo en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo evaluado (Steinke *et al.*, 2008).

Las variantes genéticas tal vez más estudiadas son los SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), las cuales son sustituciones de un nucleótido por otro en la cadena de DNA, estos constituyen hasta el 90 % de todas las variaciones genómicas humanas.

Los GWAs son estudios en los cuales se genotipifican un gran número de polimorfismos, para encontrar variantes asociadas a enfermedad y fenotipos asociados. El diseño de estos estudios con mayor frecuencia es de tipo casos y controles, en el cual las frecuencias

alélicas son comparadas entre los grupos, es de vital importancia que estos sean seleccionados de la misma población.

El éxito de los estudios GWAs, depende de la eficiente selección de polimorfismos, estos estudios han generado nuevos conocimientos en el descubrimiento de genes, sin reporte previo de su papel en cierta enfermedad, o regiones genómicas con función desconocida, los cuales se han encontrado asociados como riesgo a enfermedades complejas.

Esto se debe al gran número de SNPs que abarca, desde cientos de miles, hasta millones a lo largo de todo el genoma, como resultado de estos estudios se observan varios polimorfismos asociados a la susceptibilidad de enfermedad, pero se desconoce cuál es el polimorfismo asociado directamente al efecto biológico, ya que las asociaciones encontradas suelen ser indirectas, debido al desequilibrio de ligamiento en el que se encuentran las variantes genéticas (Anaya & Alfaro, 2010).

Es poco frecuente encontrar replicación en los hallazgos en estudios de este tipo, algunas de las principales dificultades a las que se atribuye estas diferencias, son el tamaño inadecuado de la muestra, la caracterización incompleta de genes candidatos, análisis estadísticos limitados, heterogeneidad de la muestra, entre otras causas (Steinke *et al.*, 2008).

Artritis reactiva asociada a la infección por *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis

Chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*), pertenece al género *Chlamydia*, familia *Chlamydiaceae*, orden *Chlamydiales*. Es una bacteria Gram negativa intracelular obligada, considerada como uno de los patógenos de transmisión sexual de mayor prevalencia a nivel mundial.

C. trachomatis es el patógeno más prevalente en las ETS en el mundo occidental y es el agente etiológico que subclínicamente menos se diagnostica. En Estados Unidos se han estimado cifras de hasta 4 millones de nuevos casos de infecciones por año, de los cuales se estiman que el 1.25 %, equivalente a 50000 casos, corresponden a mujeres que quedan infértiles después de la infección. Se ha calculado que un 7 % de los casos asintomáticos corresponden a pacientes de género masculino, lo que contrasta con casos de mujeres asintomáticas donde las cifras alcanzan el doble de los hombres con un 14 % (López-Hurtado y Guerra-Infante, 2002).

Esta bacteria presenta una membrana externa constituida por lipopolisacárido y una pared celular que carece de ácido murámico, su forma es cocoide y posee proteínas de membrana externa (OMP), adhesinas y el heparán sulfato. Dentro de las proteínas de membrana externa se encuentra MOMP, la cual representa un 60 % del total de las proteínas de membrana, con respecto a otras proteínas ricas en cisteína. Entre sus funciones se destacan, la integridad estructural de la membrana, acción de porina y la adhesión (López-Hurtado y Guerra-Infante, 2002). La importancia de MOMP radica en que es inmunogénica y que presenta epítomos específicos de su especie por lo que ha sido considerada útil para el desarrollo de vacunas. MOMP también tiene conformaciones alternativas que pueden adaptarse a las etapas específicas de crecimiento por la bacteria y puede impartir diferentes niveles de inmunogenicidad (López-Hurtado y Guerra-Infante, 2002).

C. trachomatis tiene un ciclo de vida bifásico con dos formas funcionales y metabólicamente distintas (Frohlich *et al.*, 2014). La forma infecciosa del organismo es el cuerpo elemental, esta existe extracelularmente y es metabólicamente inerte. Dentro del fagosoma la bacteria se diferencia en una forma replicativa metabólicamente activa, pero no infecciosa llamada cuerpo reticulado, capaz de reproducirse por fisión binaria y que dentro de la célula puede evadir el fago lisosoma.

Se considera a *C. trachomatis* como un parásito energético, puesto que carece de enzimas básicas para obtener ATP y nutrientes, por lo que utiliza la maquinaria del huésped para su metabolismo y

desarrollo. También es capaz de modificar su membrana de inclusión y de esta forma evadir la acción del sistema inmune (Matta *et al.*, 2001).

La infección causada por *C. trachomatis* en un primer encuentro esta mediada principalmente a nivel celular, mientras que la respuesta humoral, que es mediada por anticuerpos específicos, está dada principalmente por la estimulación provocada por el lipopolisacárido y la proteína MOMP y la producción de IgM e IgG (López-Hurtado y Guerra-Infante, 2002). Los anticuerpos actúan bloqueando el efecto toxico del lipopolisacárido, causado por la inducción de citoquinas pro inflamatorias como IL-1 y TNF, las cuales pueden provocar caquexia en el individuo y la adhesión de la bacteria a la célula huésped.

Este patógeno utiliza mecanismos para evadir la respuesta inmune y producir cambios celulares que permiten su supervivencia, entre estos se encuentra la regulación a la baja del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y clase II, contrarrestar la apoptosis de la célula huésped bloqueando la liberación del citocromo C desde la mitocondria hacia el citosol e inhibir la activación de la caspasa 3 y su señal pro apoptótica, con el fin de completar su ciclo reproductivo intracelular.

A pesar de esto, se ha demostrado que la respuesta de las células T, tanto CD4+ como CD8+ se activan después de la infección, con predominio de activación los linfocitos T CD8+ HLAB27+ mediado por el IFN- γ . Esta respuesta se ha descrito como factor primordial para la asociación de la infección por *Chlamydia* con la artritis reactiva ARe (Zarco, 2012).

C. trachomatis tiene un periodo de incubación entre 7 y 21 días, donde se destacan síntomas como disuria, secreciones de color crema, que puede llevar a complicaciones como linfadenopatías. La patología causada por *C. trachomatis* más frecuente en hombres es la uretritis no gonocócica (UNG), en la que la única manera de detectarla es por cultivo o serología. Otra patología es la epidídimo-orquitis, ésta es característica en jóvenes con tendencia promiscua o con más de una pareja sexual, la sintomatología está dada principalmente por secreciones moderadas o abundantes, dolor escrotal unilateral con inflamación y eritema edematoso, su diagnóstico se hace por serología (Matta *et al.*, 2001).

En mujeres las patologías características producidas por *C. trachomatis* son cervicitis y salpingitis aguda. La cervicitis cursa de forma asintomática en la mayoría de los casos, aunque un tercio de las mujeres tienen síntomas como secreciones e inflamación, secreciones mucopurulentas hiperemia y edema.

Las patologías causadas por *C. trachomatis* han tomado gran importancia, ya que estudios recientes han fortalecido la asociación microbiana con ARe, debido a la demostración de antígenos microbianos en la articulación. Varios investigadores han utilizado la reacción en cadena de la polimerasa para demostrar el hallazgo de ADN o ARN de *Chlamydia* en las articulaciones de pacientes con ARe post-infección con *C. trachomatis* lo que confirma la relación entre esta bacteria y la aparición de la ARe (Thuong *et al.*, 2007).



La artritis reactiva o síndrome de Reiter (ARe)

La artritis reactiva o síndrome de Reiter (ARe), es una enfermedad inflamatoria que pertenece al grupo de las espondiloartropatías, este daño articular compromete toda clase de articulaciones de las extremidades, produciendo una inflamación debido a la respuesta desencadenada por complejos inmunes provenientes de la infección que inicia de forma venérea (Vila, s.f.).

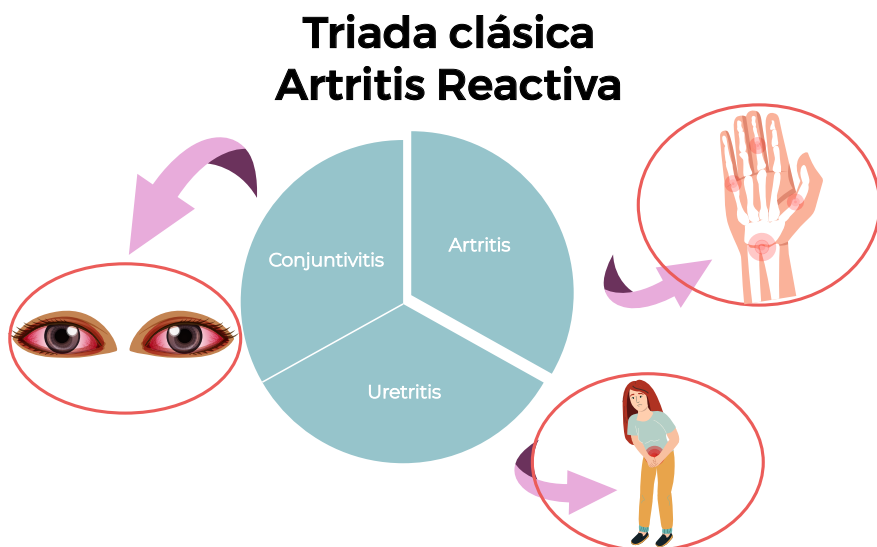
Hans Reiter diagnosticó en 1916 un soldado joven, que mostraba un cuadro clínico de poliartritis, conjuntivitis y uretritis, quien había cursado por una infección gastrointestinal por espiroquetas, este reporte sirvió de base para estudios de la artritis reactiva, es por ello que también se conoce como síndrome de Reiter (López-Hurtado y Guerra-Infante, 2002). El mismo año se reportó un cuadro similar al descrito por Reiter, en el que el paciente cursaba con diarrea, conjuntivitis y artritis. Por tal motivo, se dio importancia a esta patología y se comenzó a profundizar acerca de su etiología. No hay pruebas de laboratorio específicas para diagnosticar la enfermedad, el médico tratante debe hacer una anamnesis de todo el cuadro clínico y el historial del paciente apoyado en radiografías, cuadro hemático y la infección cursante por microorganismos (Pila, *et al.*, 2009).

Sin embargo, fue hasta después de la segunda guerra mundial, por una epidemia en Finlandia, causada por *Shigella flexneri*, que se estudió y se ratificó la relación entre infecciones por microorganismos con la artritis, en donde el 0,2 % de la población afectada presentó la complicación, gracias a esto se hizo seguimiento a las personas que padecieron la enfermedad, de las cuales la mayoría presentó complicaciones articulares (Tejera, *et al.*, 2012).

Con mayor frecuencia ARe se asocia a personas genéticamente susceptibles que se infectan con microorganismos. A nivel bacteriano se sabe que los Gram negativos especialmente *Chlamydia*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Neisseria* y *Campylobacter*, causales de infecciones gastrointestinales o urogenitales, se han relacionado con casos de ARe (Almodóvar & Zarco, 2013; Llorente, 2009).

En la forma venérea, la especie *C. trachomatis* es una de las más frecuentemente asociadas a ARe sobre todo en personas que están en edades entre los 20 y 40 años teniendo mayor impacto en hombres que en mujeres y presentando la triada clásica de uretritis, conjuntivitis y artritis (Almodóvar & Zarco, 2013; Llorente 2009; Ostaszewska-Puchalska *et al.*, 2015) como se observa en la figura 1.

Figura 1. Triada clásica Artritis Reactiva





Toll-like receptor, *C. trachomatis* y Artritis reactiva

A nivel inmunológico se ha descrito que *C. trachomatis* a través de sus componentes proteicos estimula receptores tipo Toll o TLR's, los cuales se encuentran estrechamente relacionados con la producción de Are (Al-Kuhlani, *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2016).

Los TLR's pertenecen a la respuesta inmune innata y juegan un papel importantes en la línea inicial de defensa contra PAMP's, de manera extracelular son fundamentales para el reconocimiento de estos patrones e intracelularmente son de gran importancia en la activación de vías de señalización (Al-Kuhlani, *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2016). Algunos polimorfismos reportados en los TLR's han asociado resistencia o susceptibilidad a diferentes enfermedades, pues estos cambios en la secuencia de ADN pueden modificar la respuesta inmune del individuo al medio ambiente y a algunos patógenos (Anyelo, *et al.*, 2014; Crespo-Lessmann, *et al.*, 2010).

En la ARe, la inflamación es generada posterior a ciertas infecciones bacterianas en personas genéticamente susceptibles, como se ha descrito algunos PAMP's asociados desarrollo de prostatitis crónica, enfermedad inflamatoria pélvica o biopelículas bacterianas, es así como *C. trachomatis* causa la triada inflamatoria, algunos autores sugieren que estos procesos inflamatorios están mediados por la estimulación de receptores tipo Toll que presentan determinados polimorfismos, por lo que en el caso de ARe habrá manifestación en individuos genéticamente susceptibles, causando inflamación crónica que se produce en forma de entesitis inflamación de la zona de inserción de un tendón, de un ligamento, de una cápsula o de una fascia en un hueso (Almodóvar & Zarco, 2013; Joosten, *et al.*, 2016; Arend & Firestein, 2012; García-Kutzbach, *et al.*, 2018; Hacquard-Bouder, 2009). Recientemente, varios estudios han evaluado los roles potenciales de algunos los polimorfismos descritos en TLR's asociados al desarrollo de algunas espondiloartropatías, aunque los resultados de estos estudios muestran gran variabilidad, es importante recordar que la frecuencia de los polimorfismos varía entre las diversas poblaciones humanas.

Como resultado de la revisión se encontró un total de 1283 pacientes con espondiloartropatías que fueron diagnosticados con *C.trachomatis*, en pacientes sintomático y asintomáticos. En los estudios reportados en la base de datos de PubMed, durante los años (2001-2020), en diferentes zonas geográficas del mundo, 347 pacientes que padecían síntomas articulares se asociaron con *C.tracomatis*, el resto presentaban espondiloartropatía a causa de otro microorganismo u otra afectación articular no asociada a infecciones (tabla 1).

Tabla 1. Presencia de *C.trachomatis* con espondiloartropatías

Autores, año	País	P	C	Ct+ARe
Sharma <i>et al.</i> , 2020	India	85	20	24
Cristea <i>et al.</i> , 2019	Rumania	27	26	5
Ostaszewska-Puchalska <i>et al.</i> , 2015	Polonia	323	125	42
Kumar <i>et al.</i> , 2014	India	38	38	19
Kumar <i>et al.</i> , 2016	India	20	20	6
Kuipers <i>et al.</i> , 2009	N. África	23	25	3
Savolainen <i>et al.</i> , 2009	Finlandia	122	78	42
Siala <i>et al.</i> , 2009	Túnez	34	14	20
Butrimiene <i>et al.</i> , 2006	Lituania	120	52	34
Wilkinson, et. al Ward, 2004	UK	49	11	15

Pavlica <i>et al.</i> , 2003	Serbia	18	16	4
Nikkari <i>et al.</i> , 2001	Finlandia	132	25	39
Fendler <i>et al.</i> , 2001	Alemania	52	74	24
Schumacher. <i>et al.</i> 2001	EE.UU	188	24	61
Schnarr <i>et al.</i> , 2001	Alemania	52	3	9
Total		1283	551	347

Fuente: elaboración propia.

Un total de 1283 pacientes se han estudiado en distintos países, siendo 347 individuos los que poseen *C. trachomatis* y presentan síntomas articulares (N. África): Norte de África: Algeria, Marruecos, Túnez (UK): Reino Unido, (P): Número de Pacientes en estudio, (C): Población control,(Ct+ARe): Pacientes con artritis reactiva asociada a *C. trachomatis*.

Relación de receptores tipo Toll y sus polimorfismos en pacientes diagnosticados con *C. trachomatis*

Posterior a revisar estudios seleccionados por su idoneidad, los cuales comprenden entre los años 2006-2016, se evidencia que hay estudios poblacionales que han demostrados la asociación de algunos TLR´s y la infección por *C. trachomatis*, en el caso de TLR6 pese a que se incluyó en el estudio de Taylor D. *et al.*, no demostró se encontró asociación estadísticamente significativa con la infección por *C. trachomatis*, como se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Asociación de TLR´s y la infección por *C. trachomatis*

TLR	Autor	País	Ct/n	TLR+Ct
TLR1	Taylor et al., 2012	EE.UU	94/290	Si
	Verweij et al., 2016	Países Bajos	322/731	Si
TLR2	Taylor et al., 2012	EE.UU	94/290	No
	Agrawal et al., 2011	India	127/279	Si
	Verweij et al., 2016	Países Bajos	322/731	No
TLR4	Taylor et al., 2012	EE.UU	94/290	Si
	Agrawal et al., 2011	India	127/219	Si
	den Hartog et al., 2006	Países Bajos	39/227	Si
TLR6	Taylor et al., 2012	EE.UU	94/290	No
TLR9	Verweij et al., 2016	Países Bajos	322/731	Si
	den Hartog et al., 2006	Países Bajos	39/227	Si

(Ct/n): casos de *C. trachomatis*/población de estudio, (TLR+Ct): Asociación entre TLR y Ct (Si): asociación estadísticamente significativa en el estudio, (No): no se describe asociación estadísticamente significativa en el estudio.

Fuente: elaboración propia.

En cuanto a los estudios en los cuales se han tratado la posible asociación entre la frecuencia de un polimorfismo de los TLR (1, 2, 4, 6 y 9) y su relación con la susceptibilidad a *C. trachomatis*, son escasos los que han reportado una relación entre estas variables, como se observa en la tabla 3. No se encontraron abundantes investigaciones en las cuales se evalué el mismo SNP en diferentes poblaciones, lo que permitiría corroborar la asociación entre los SNP's con la infección a *C. trachomatis* o con aquellos individuos portadores asintomáticos, sin embargo, es de resaltar los estudios de asociación para el SNP rs4986790 (TLR 4), reportados con la misma nacionalidad, a pesar que sus resultados son contradictorios, el estudio de este SNP, en poblaciones con diferencias geográficas permitiría evidenciar la posible asociación del mismo y la susceptibilidad a la infección por *C. trachomatis*.

Tabla 3. SNP's asociados a la infección por *C.trachomatis*

TLR	SNP	Autores	País	Asociación
TLR1	rs5743618	Taylor <i>et al.</i> , 2012	EE.UU	si
	rs5743817	Taylor <i>et al.</i> , 2012	EE.UU	no
	rs4833095	Taylor <i>et al.</i> , 2012	EE.UU	si
TLR2	rs3804099	Taylor <i>et al.</i> , 2012	EE.UU	no
	rs11938228	Taylor <i>et al.</i> , 2012	EE.UU	no
	rs1898830	Taylor <i>et al.</i> , 2012	EE.UU	no
	rs5743708	Verweij <i>et al.</i> , 2016	Países Bajos	si
	rs4696480	Verweij <i>et al.</i> , 2016	Países Bajos	no

TLR	SNP	Autores	País	Asociación
TLR4	rs1927911	Taylor <i>et al.</i> , 2012	EE.UU	si
	rs4986790	Verweij <i>et al.</i> , 2016	Países Bajos	no
		den Hartog <i>et al.</i> , 2006	Países Bajos	si
TLR6	rs1039559	Taylor <i>et al.</i> , 2012	EE.UU	no
	rs5743810	Taylor <i>et al.</i> , 2012	EE.UU	no
	rs11536889	Taylor <i>et al.</i> , 2012	EE.UU	no
	rs5030728	Taylor <i>et al.</i> , 2012	EE.UU	no
TLR9	rs5743836	Verweij <i>et al.</i> , 2016	Países Bajos	si
	rs352140	Verweij <i>et al.</i> , 2016	Países Bajos	si

Fuente: elaboración propia.

En la tabla se encuentran 16 de los polimorfismos encontrados en la revisión de la literatura, los SNP de (TLR) Toll like receptor se analizaron en el 2012 al 2016, 7 (SNP) Polimorfismos de nucleótido simple están asociados a la infección por *C. trachomatis*.

Los Toll Like Receptor (TLR) están relacionados con diferentes espondiloartropatías

Se reportan varias enfermedades articulares publicadas en la base de datos Pubmed, asociadas con los Toll Like Receptor, como espondiloartritis, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis idiopática, espondilitis anquilosante, entre otras.

Se pueden agrupar los resultados obtenidos entre aquellos TLR's con escasa evidencia de asociación a espondiloartropatías, entre estos se agruparon los TLR's 1,3, 5 -10, como se observa en la figura 2.

Figura 2, parte 1. Espondilo artropatías más frecuentes asociadas a TLR's

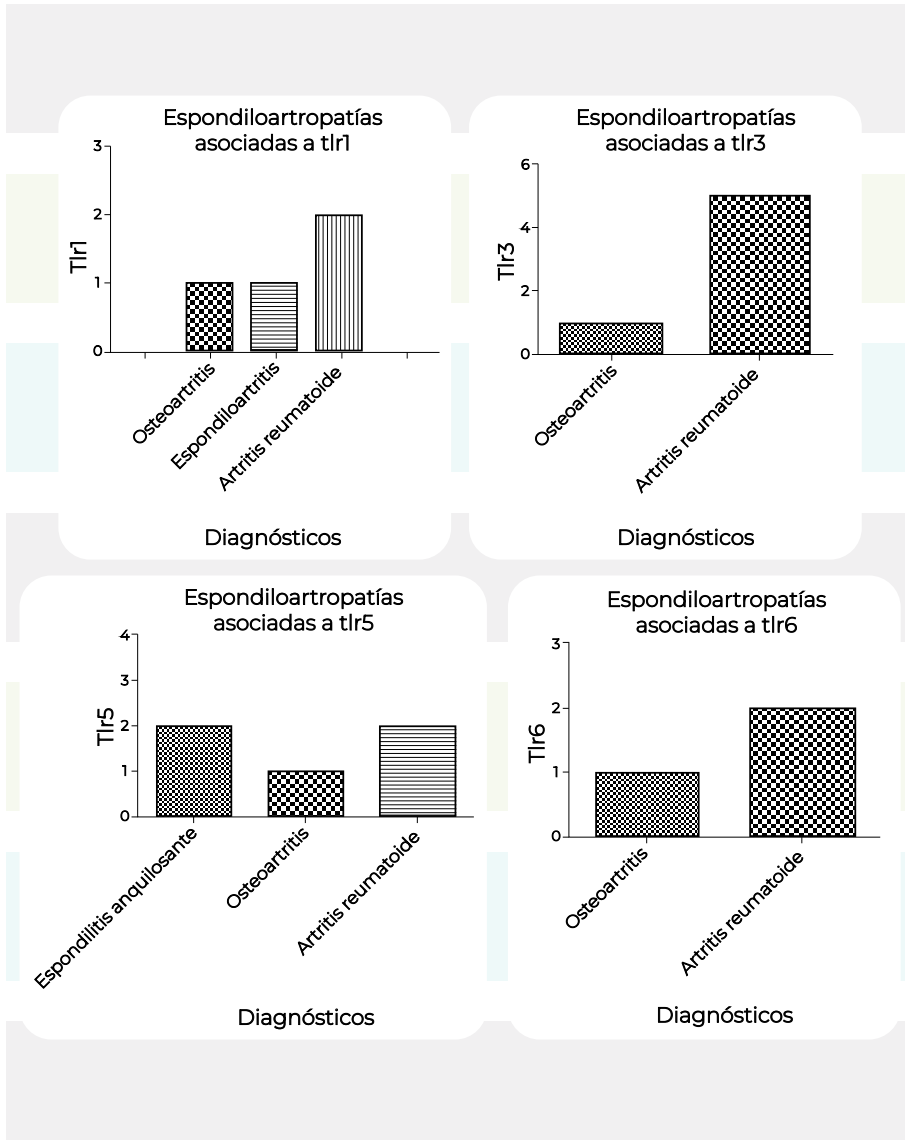
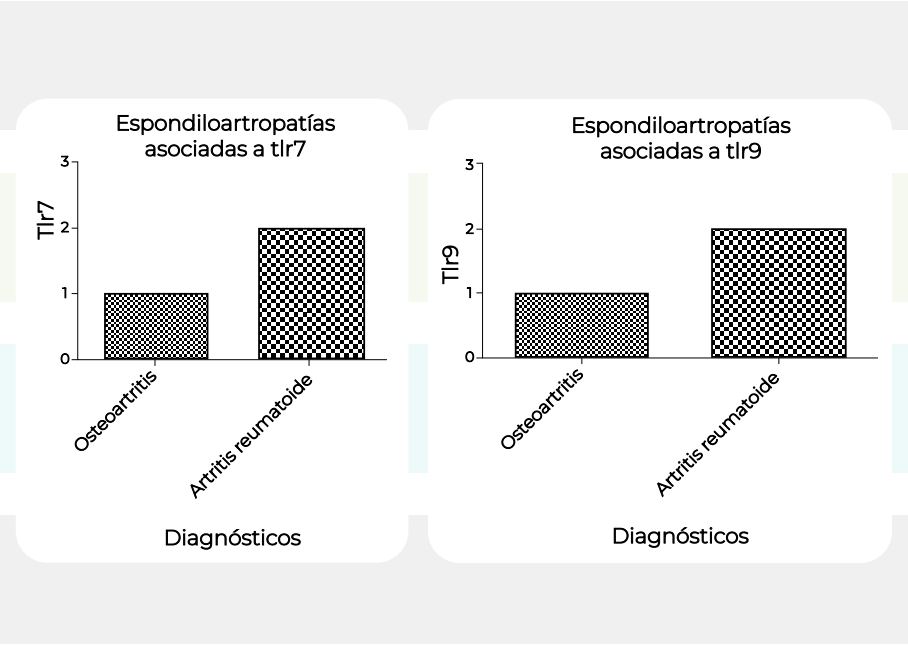


Figura 2, parte 2. Espondilo artropatías más frecuentes asociadas a TLR´s



Asimismo, se ha reportado una escasa evidencia de asociación entre el TLR1 y la inflamación articular como la espondilitis anquilosante, sin embargo, hay evidencias de asociación con osteoartritis, espondiloartritis y artritis reumatoide, ver tabla 4, y figura 2.

Tabla 4. TLR´s están relacionados con diferentes espondiloartropatía

TLR	Autor	País	TLR+A	Diagnóstico
TLR1	Zhang <i>et al.</i> , 2019	China	no	Espondilitis anquilosante
	Barreto <i>et al.</i> , 2017	Finlandia	si	Osteoartritis
	Kragstrup <i>et al.</i> , 2015	Dinamarca	si	Espondiloartritis

TLR	Autor	País	TLR+A	Diagnóstico
TLR1	Tamaki <i>et al.</i> , 2011	Japón	si	Artritis Reumatoide
	Ospelt <i>et al.</i> , 2008	Suiza	si	Artritis Reumatoide
	Zhang <i>et al.</i> , 2019	China	si	Espondilitis anquilosante
	Liu <i>et al.</i> , 2017	China	si	Osteoartritis
	Barreto <i>et al.</i> , 2017	Finlandia	si	Osteoartritis
	Eser & Sahin, 2016	Turquía	si	Artritis Reumatoide
	Lacerte <i>et al.</i> , 2016	Canadá	si	Artritis Reumatoide
	Kragstrup <i>et al.</i> , 2015	Dinamarca	si	Espondiloartritis
	Savic <i>et al.</i> , 2014	UK	si	Artritis Reumatoide
	Lee <i>et al.</i> , 2014	Corea	si	Artritis Reumatoide
TLR2	Nair <i>et al.</i> , 2012	EE.UU	si	Osteoartritis
	Carrasco <i>et al.</i> , 2011	Brasil	si	Artritis psoriásica
	Myles & Aggarwal, 2011	India	si	Artritis idiopática
	Tamaki <i>et al.</i> , 2011	Japón	si	Artritis Reumatoide
	Ospelt <i>et al.</i> , 2008	Suiza	si	Artritis Reumatoide
	Candia <i>et al.</i> , 2007	EE.UU	si	Artritis Psoriásica
	Varoga <i>et al.</i> , 2006	Alemania	si	Artritis Bacteriana
	Pierer <i>et al.</i> , 2004	Suiza	si	AR y OA

TLR	Autor	País	TLR+A	Diagnóstico
TLR2	Zhang <i>et al.</i> , 2019	China	no	Espondilitis anquilosante
	Barreto <i>et al.</i> , 2017	Finlandia	si	Osteoartritis
	Kragstrup <i>et al.</i> , 2015	Dinamarca	no	Espondiloartritis
	Lee <i>et al.</i> , 2014	Corea	si	Artritis Reumatoide
	Tamaki <i>et al.</i> , 2011	Japón	si	Artritis Reumatoide
TLR3	Roelofs <i>et al.</i> , 2009	Países Bajos	si	Artritis Reumatoide
	Ospelt <i>et al.</i> , 2008	Suiza	si	Artritis Reumatoide
	Roelofs <i>et al.</i> , 2005	Países Bajos	si	Artritis Reumatoide
	Zhang <i>et al.</i> , 2019	China	si	Espondilitis anquilosante
	Barreto <i>et al.</i> , 2017	Finlandia	si	Osteoartritis
	Eser & Sahin, 2016	Turquía	no	Artritis Reumatoide
	Kragstrup <i>et al.</i> , 2015	Dinamarca	si	Espondiloartritis
	Savic <i>et al.</i> , 2014	UK	si	Artritis Reumatoide
	Lee <i>et al.</i> , 2014	Corea	si	Artritis Reumatoide
	Nair <i>et al.</i> , 2012	EE.UU	si	Osteoartritis
TLR4	Carrasco <i>et al.</i> , 2011	Brasil	no	Artritis psoriásica
	Myles & Aggarwal, 2011	India	si	Artritis idiopática
	Tamaki <i>et al.</i> , 2011	Japón	si	Artritis Reumatoide

TLR	Autor	País	TLR+A	Diagnóstico
TLR4	Assassi <i>et al.</i> , 2011	EE.UU	si	Espondilitis anquilosante
	Ospelt <i>et al.</i> , 2008	Suiza	si	Artritis Reumatoide
	Yang <i>et al.</i> , 2007	China	si	Espondilitis anquilosante
	Candia <i>et al.</i> , 2007	EE.UU	no	Artritis Psoriásica
	Zhang <i>et al.</i> , 2019	China	si	Espondilitis anquilosante
	Barreto <i>et al.</i> , 2017	Finlandia	si	Osteoartritis
TLR5	Assassi <i>et al.</i> , 2011	EE.UU	si	Espondilitis anquilosante
	Tamaki <i>et al.</i> , 2011	Japón	si	Artritis Reumatoide
	Ospelt <i>et al.</i> , 2008	Suiza	si	Artritis Reumatoide
	Zhang <i>et al.</i> , 2019	China	no	Espondilitis anquilosante
	Barreto <i>et al.</i> , 2017	Finlandia	si	Osteoartritis
TLR6	Tamaki <i>et al.</i> , 2011	Japón	si	Artritis Reumatoide
	Ospelt <i>et al.</i> , 2008	Suiza	si	Artritis Reumatoide
	Zhang <i>et al.</i> , 2019	China	no	Espondilitis anquilosante
	Barreto <i>et al.</i> , 2017	Finlandia	si	Osteoartritis
	Roelofs <i>et al.</i> , 2009	Países Bajos	si	Artritis Reumatoide
TLR7	Ospelt <i>et al.</i> , 2008	Suiza	no	Artritis Reumatoide
	Roelofs <i>et al.</i> , 2005	Países Bajos	si	Artritis Reumatoide

TLR	Autor	País	TLR+A	Diagnóstico
TLR7	Zhang <i>et al.</i> , 2019	China	no	Espondilitis anquilosante
TLR8	Barreto <i>et al.</i> , 2017	Finlandia	si	Osteoartritis
	Ospelt <i>et al.</i> , 2008	Suiza	no	Artritis Reumatoide
	Zhang <i>et al.</i> , 2019	China	no	Espondilitis anquilosante
	Barreto <i>et al.</i> , 2017	Finlandia	si	Osteoartritis
	Lacerte <i>et al.</i> , 2016	Canadá	si	Artritis Reumatoide
TLR9	Kragstrup <i>et al.</i> , 2015	Dinamarca	no	Espondiloartritis
	Tamaki <i>et al.</i> , 2011	Japón	si	Artritis Reumatoide
	Ospelt <i>et al.</i> , 2008	Suiza	no	Artritis Reumatoide
	Zhang <i>et al.</i> , 2019	China	si	Artritis Reumatoide
TLR10	Torices <i>et al.</i> , 2016	España	si	Artritis Reumatoide
	Ospelt <i>et al.</i> , 2008	Suiza	no	Artritis Reumatoide

TLR y asociación a alguna espondiloartropatía. AR y OA: Artritis Reumatoide y Osteoartritis.

Fuente: elaboración propia.

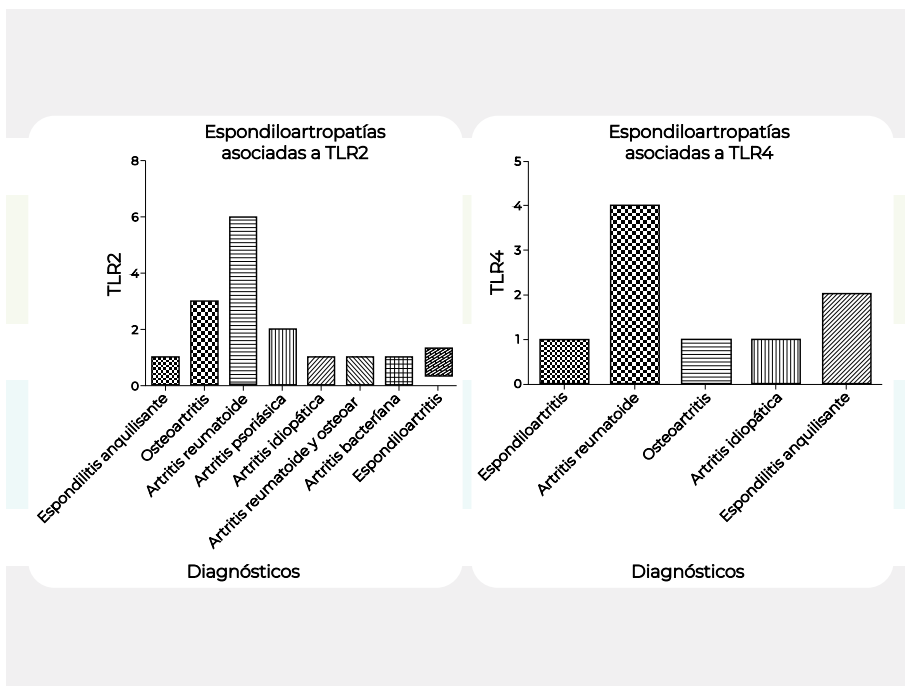
Referente a los TLR3, 6, 7 y 9, se encuentra escaso reporte de estudios que asocian con patologías como osteoartritis, artritis reumatoide, ver figura 2. En todos los casos se han reportados con mayor frecuencia estudios de asociación con artritis reumatoide, esto se puede explicar debido que es una de las enfermedades autoinmunes de mayor frecuencia en la población, por lo cual es de mayor interés para la comunidad científica; sin embargo, es necesario el desarrollo

de nuevos estudios que permitan evaluar posibles asociaciones con otras espondiloartropatías de baja frecuencia y en otras poblaciones en el mundo.

En lo referente a los TLR2 y 4, se ha encontrado mayor evidencia de asociación de estos TLR's, un mayor número de enfermedades como se observa en la figura 3, en el cual se evidencia para el TLR 2 enfermedades como espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis idiopática, artritis bacteriana y espondilo artritis, donde se observa con mayor frecuencia las publicaciones que encuentran asociación con artritis reumatoide, ver figura 3.

No se han reportado un número tan amplio de enfermedades asociadas con TLR4 en comparación con TLR2, entre estas se encuentra espondiloartritis, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis idiopática y espondilitis anquilosante, de las cuales la de mayor frecuencia es artritis reumatoide, ver figura 3.

Figura 3. TLR 2 y 4 presentan mayor asociación al desarrollo de espondilo artropatías



Se observa en la gráfica que el diagnóstico más frecuentemente asociado a TLR2 y TLR4 es artritis reumatoide.



El rol de TLR 4 en la respuesta inmune

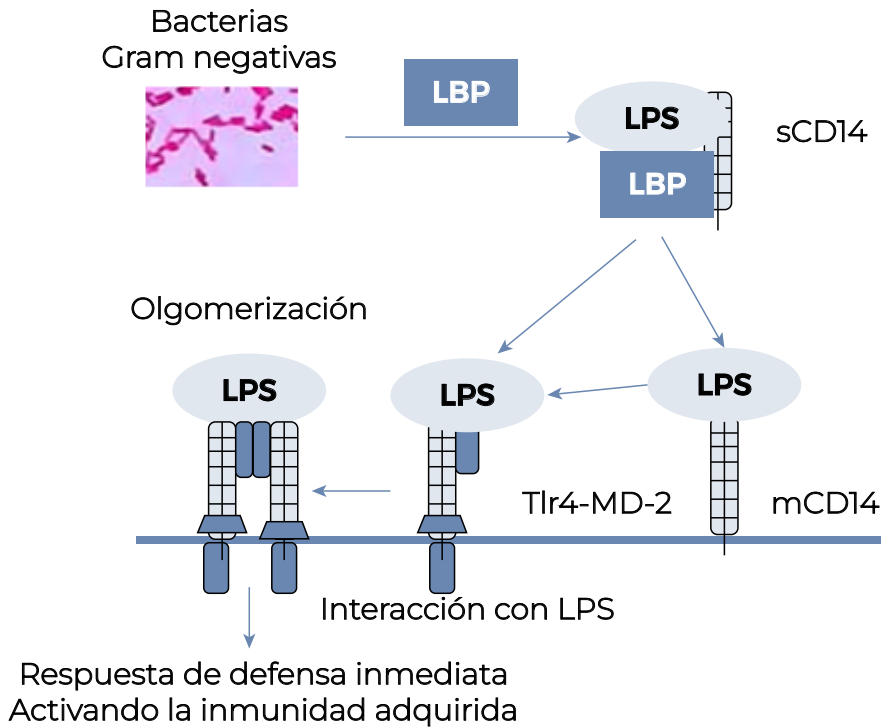
El gen que codifica para el TLR4 se encuentra ubicado en el cromosoma 9 banda q33.1 del humano, este está altamente conservado desde *Drosophila* hasta el humano, y comparten similitudes funcionales y estructurales, estos reconocen patrones moleculares asociados a patógenos y median la producción de citoquinas, este receptor está involucrado en la señalización de LPS, presente en las bacterias Gram Negativas.

El complejo de reconocimiento de LPS está compuesto por varias proteínas que participan entre ellas y permiten dar inicio a la señalización intracelular, de la cual se produce una respuesta inflamatoria, las proteínas involucradas son la proteína de unión a lípidos, CD14, MD2, TLR4.

El LPS, es un componente glicolípido de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, está compuesto de tres regiones unidas de forma covalente: el lípido A responsable de la toxicidad, tiene un núcleo oligosacárido compuesto por diez residuos sacáridos y en la región más externa la cadena lateral O, altamente variable y determina la especificidad antigénica del LPS, compuesta de varias unidades repetidas de tetrasacáridos (Simpson & Martinez, 2010).

Las bacterias Gram Negativas presentan en su membrana externa LPS, el cual es procesado por la proteína de unión a LPS (LBP) y CD14. La proteína LBP remueve el LPS de la membrana externa y forma complejos conformados por LPS, LPB y CD14s. Este complejo entrega el LPS a CD14m desencadenando la señalización de LPS, unido este al CD14 es transferido al complejo TLR4 –MD2, el cual posterior oligomerización desencadena la señal vía TLR activando la respuesta inmune (Miyake, 2004). (Figura 4).

Figura 4. Reconocimiento innato de lipopolisacárido por el receptor tipo Toll 4-MD-2



El rol de TLR 2 en la respuesta inmune

El gen que codifica para el TLR2 se encuentra ubicado en el cromosoma 4q32 en el humano, el cual está altamente conservado desde *Drosophila* hasta el humano, y comparten similitud funcional y estructural, estos reconocen patrones moleculares asociados a patógenos y median la producción de citoquinas (Arancibia Zunino, 2006).

TLR2 se expresa en la microglía, células de Schwann, monocitos, macrófagos, células dendríticas, leucocitos polimorfonucleares, células B y células T, incluyendo células T reguladoras. En algunos casos, se produce en un heterodímero, por ejemplo, se combina con TLR1 o TLR6.

Otras células en las cuales se expresa se encuentran, en el epitelio de los conductos de aire, alvéolos pulmonares, túbulos renales, y cápsulas de Bowman en corpúsculos renales.

La vías de señalización mediadas por TLR2 comprenden la vía clásica, que involucra el reclutamiento de la proteína MyD88 y una alternativa donde participa la Fosfoinositol 3-Quinasa (PI3K). A su vez, los glucocorticoides (GCs) son moléculas que suprimen la inflamación y la inmunidad adaptativa, que recientemente han sido reportadas como potenciadoras de la expresión de ciertas moléculas de la inmunidad innata, tales como el TLR2 (Thuong *et al.*, 2007).

Varios SNPs del gen TLR2 se han reportado asociados a diferentes patologías, entre los más frecuentes sobresalen, rs1898830, conocido como -15607A / G que se asocia con la excreción y la frecuencia de la lesión de herpes viral simplex genital tipo 2 (Bochud *et al.*, 2007). También se encuentra; rs3804099, conocido como T597C que ha sido asociado con un mayor riesgo de meningitis tuberculosa (Thuong *et al.*, 2007). Además, una investigación realizada por Park y colaboradores, estudió dos SNPs en conjunto, en el que reportaron un fuerte efecto protector contra el desarrollo de la diabetes tipo 1 en una población coreana (Park *et al.*, 2004). El SNP rs 5743708 del gen TLR2 se ha asociado a ARE, en un estudio realizado en 23 pacientes canadienses con diagnóstico de infección por *Salmonella enteritidis*, donde se encontró asociación de ARE con la variante TLR2 rs 5743708.

Conclusiones

El estudio de enfermedades complejas requiere de la investigación, no solo de las interacciones entre el agente causal y el desarrollo de los síntomas en cada individuo, además de las múltiples interacciones entre la respuesta inmune del paciente y del patógeno *C. trachomatis* y a su vez, están mediadas por el *background* genético del paciente, es así, que múltiples SNP's, pueden hacerlo resistente o susceptible a una enfermedad, en el caso de las infecciones por *C. trachomatis*, no está involucrado solamente en el proceso de la infec-

ción aguda, sino que además la presencia de estas variables, pueden predisponerlo al desarrollo de espondilo artropatías.

Aunque son escasas las evidencias de las asociaciones de algunos de los SNP´s, con el desarrollo de estas patologías, es necesarios fortalecer la continua búsqueda de SNP´s asociados a otras espondiloartropatías diferentes a Artritis reumatoide, la cual es la que se diagnostica con mayor frecuencia.

Otras de las áreas de desarrollo es continuar la búsqueda de estos SNP´s en otras poblaciones, ya que las frecuencias alélicas varían entre las diferentes etnias y agrupaciones humanas en el mundo. Estas investigaciones, permitirán brindar a la comunidad científica un mayor entendimiento de las interacciones del patógeno *C. trachomatis*, y la respuesta inmune (moderada por la herencia genética del individuo), además de las posibles interacciones con el ambiente, es así, que el entendimiento de las enfermedades complejas debe abarcar la comprensión de todas las interacciones del individuo.

Referencias bibliográficas

Agrawal, T., Bhengraj, A. R., Vats, V., Salhan, S., & Mittal, A. (2011). Expression of TLR 2, TLR 4 and iNOS in cervical monocytes of Chlamydia trachomatis-infected women and their role in host immune response. *American Journal of Reproductive Immunology*, 66(6), 534–543. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01064.x>

Al-Kuhlani M, Lambert C, Pal S, de la Maza L, Ojcius DM. (2020). Immune response against Chlamydia trachomatis via toll-like receptors is negatively regulated by SIGIRR. 15(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230718>

Almodóvar, R., & Zarco , P. (2013). Otras espondiloartritis: Artritis reactiva y artritis relacionadas con la enfermedad inflamatoria intestinal. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(31), 1924–1937. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(13\)70557-2](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(13)70557-2)

Anaya, Y., & Alfaro, B. (2010). Genome-wide association studies (GWAs) and its contribution to the genetic of asthma. *Revista Salud Uninorte*, 26, 223–231.

Anyelo, Álvarez-Mon, Nereida Valero. (2014). *Papel de los receptores tipo toll (TLRs) y receptores para dominios de oligomerización para la unión a nucleótidos (NLRs) en las infecciones virales*. 55(1). http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-513320140001000008

Arancibia, S. (2006). *Regulación de moléculas de la inmunidad innata por glucocorticoides: Papel de la fosfoinositol 3-quinasa en la vía de señalización del receptor tipo toll 2 (TLR2)*. <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/105556>

Arend, W. P., & Firestein, G. S. (2012). Pre-rheumatoid arthritis: Pre-disposition and transition to clinical synovitis. *Nature Reviews. Rheumatology*, 8(10), 573–586. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.134>

Assassi, S., Reveille, J. D., Arnett, F. C., Weisman, M. H., Ward, M. M., Agarwal, S. K., Gourh, P., Bhula, J., Sharif, R., Sampat, K., Mayes, M. D., & Tan, F. K. (2011). Whole-blood gene expression profiling in ankylosing spondylitis shows upregulation of toll-like receptor 4 and 5. *The Journal of Rheumatology*, 38(1), 87–98. <https://doi.org/10.3899/jrheum.100469>

Balding, D. J. (2006). A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nature Reviews. Genetics*, 7(10), 781–791. <https://doi.org/10.1038/nrg1916>

Barreto, G., Sandelin, J., Salem, A., Nordström, D. C., & Waris, E. (2017). Toll-like receptors and their soluble forms differ in the knee and thumb basal osteoarthritic joints. *Acta Orthopaedica*, 88(3), 326–333. <https://doi.org/10.1080/17453674.2017.1281058>

Bochud, P.-Y., Magaret, A. S., Koelle, D. M., Aderem, A., & Wald, A. (2007). Polymorphisms in TLR2 are associated with increased viral shedding and lesional rate in patients with genital herpes simplex virus Type 2 infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 196(4), 505–509. <https://doi.org/10.1086/519693>

Butrimiene, I., Ranceva, J., & Griskevicius, A. (2006). Potential triggering infections of reactive arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 35(6), 459–462. <https://doi.org/10.1080/03009740600906750>

Candia, L., Marquez, J., Hernandez, C., Zea, A. H., & Espinoza, L. R. (2007). Toll-like receptor-2 expression is upregulated in antigen-presenting cells from patients with psoriatic arthritis: A pathogenic role for innate immunity? *The Journal of Rheumatology*, 34(2), 374–379.

Carrasco, S., Neves, F. S., Fonseca, M. H., Gonçalves, C. R., Saad, C. G. S., Sampaio-Barros, P. D., & Goldenstein-Schainberg, C. (2011). Toll-like receptor (TLR) 2 is upregulated on peripheral blood monocytes of patients with psoriatic arthritis: A role for a gram-positive inflammatory trigger? *Clinical and Experimental Rheumatology*, 29(6), 958–962.

Crespo-Lessmann, A., Juárez-Rubio, C., & Plaza-Moral, V. (2010). *Role of Toll-Like Receptors in Respiratory Diseases*. 46(3), 135–142.

Cristea, D., Trandafir, M., Bojinca, V. C., Ciontea, A. S., Andrei, M. M., Popa, A., Lixandru, B. E., Militaru, C. M., Nascutiu, A. M., Predeteanu, D., Ionescu, R., Popescu, C., Cotar, A. I., Popa, M. I., Spandidos, D. A., & Codita, I. (2019). Usefulness of complex bacteriological and serological analysis in patients with spondyloarthritis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 17(5), 3465–3476. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7336>

den Hartog, J. E., Ouburg, S., Land, J. A., Lyons, J. M., Ito, J. I., Peña, A. S., & Morré, S. A. (2006). Do host genetic traits in the bacterial sensing system play a role in the development of Chlamydia trachomatis-associated tubal pathology in subfertile women? *BMC Infectious Diseases*, 6, 122. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-122>

Llorente Molina, D., y Cedeño Llorente, S.. (2009). Síndrome de Reiter. *Archivos de Medicina*, 5(1).

Eser, B., & Sahin, N. (2016). Evaluation of toll-like receptor-2 and 4 and interleukin-6 gene expressions in Turkish rheumatoid arthritis patients. *Clinical Rheumatology*, 35(11), 2693–2697. <https://doi.org/10.1007/s10067-016-3282-1>

Fendler, C., Laitko, S., Sörensen, H., Gripenberg-Lerche, C., Groh, A., Uksila, J., Granfors, K., Braun, J., & Sieper, J. (2001). Frequency of triggering bacteria in patients with reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis and the relative importance of the tests used for diagnosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 60(4), 337–343. <https://doi.org/10.1136/ard.60.4.337>

Frohlich, K. M., Hua, Z., Quayle, A. J., Wang, J., Lewis, M. E., Chou, C., Luo, M., Buckner, L. R., & Shen, L. (2014). Membrane vesicle production by Chlamydia trachomatis as an adaptive response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00073>

García-Kutzbach, A., Chacón-Súchite, J., García-Ferrer, H., & Ira-heta, I. (2018). Reactive arthritis: Update 2018. *Clinical Rheumatology*, 37(4), 869–874. <https://doi.org/10.1007/s10067-018-4022-5>

Hacquard-Bouder, M. B. (2009). *Artritis reactivas*. 42(3), 1–10.

Joosten, L. A. B., Abdollahi-Roodsaz, S., Dinarello, C. A., O'Neill, L., & Netea, M. G. (2016). Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: New developments. *Nature Reviews. Rheumatology*, 12(6), 344–357. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.61>

Kragstrup, T. W., Andersen, T., Holm, C., Schiøttz-Christensen, B., Jurik, A. G., Hvid, M., & Deleuran, B. (2015). Toll-like receptor 2 and 4 induced interleukin-19 dampens immune reactions and associates inversely with spondyloarthritis disease activity. *Clinical and Experimental Immunology*, 180(2), 233–242. <https://doi.org/10.1111/cei.12577>

Kuipers, J. G., Sibilia, J., Bas, S., Gaston, H., Granfors, K., Vischer, T. L., Hajjaj-Hassouni, N., Ladjouze-Rezig, A., Sellami, S., Wollenhaupt, J., Zeidler, H., Schumacher, H. R., & Dougados, M. (2009). Reactive and undifferentiated arthritis in North Africa: Use of PCR for detection of Chlamydia trachomatis. *Clinical Rheumatology*, 28(1), 11–16. <https://doi.org/10.1007/s10067-008-0968-z>

Kumar, P., Bhakuni, D. S., & Rastogi, S. (2014). Diagnosis of Chlamydia trachomatis in patients with reactive arthritis and undifferentiated spondyloarthropathy. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(5), 648–654. <https://doi.org/10.3855/jidc.3644>

Lacerte, P., Brunet, A., Egarnes, B., Duchêne, B., Brown, J. P., & Gosselin, J. (2016). Overexpression of TLR2 and TLR9 on monocyte subsets of active rheumatoid arthritis patients contributes to enhance responsiveness to TLR agonists. *Arthritis Research & Therapy*, 18(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0901-1>

Lee, S.-Y., Yoon, B.-Y., Kim, J.-I., Heo, Y.-M., Woo, Y.-J., Park, S.-H., Kim, H. Y., Kim, S.-I., & Cho, M.-L. (2014). Interleukin-17 increases the expression of Toll-like receptor 3 via the STAT3 pathway in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Immunology*, 141(3), 353–361. <https://doi.org/10.1111/imm.12196>

Liu, Y.-X., Wang, G.-D., Wang, X., Zhang, Y.-L., & Zhang, T.-L. (2017). Effects of TLR-2/NF-κB signaling pathway on the occurrence of dege-

nerative knee osteoarthritis: An in vivo and in vitro study. *Oncotarget*, 8(24), 38602–38617. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16199>

López-Hurtado, M., y Guerra-Infante F. (2002). Papel de los anticuerpos en el desarrollo de la infección por *Chlamydia trachomatis* y su utilidad en el diagnóstico. *Perinatol Reprod Hum*.16(3), 140–150.

Matta, S., Arango, Á. I., & Visbal, J. (2001). *Chlamydia trachomatis*: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. *Revista MVZ Córdoba*. <https://doi.org/10.21897/rmvz.528>

Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 1(2), 135–145. <https://doi.org/10.1038/35100529>

Miyake, K. (2004). Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends in Microbiology*, 12(4), 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.02.009>

Myles, A., & Aggarwal, A. (2011). Expression of Toll-like receptors 2 and 4 is increased in peripheral blood and synovial fluid monocytes of patients with enthesitis-related arthritis subtype of juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology*, 50(3), 481–488. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq362>

Nair, A., Kanda, V., Bush-Joseph, C., Verma, N., Chubinskaya, S., Mieczek, K., Glant, T. T., Malfait, A.-M., Crow, M. K., Spear, C. T., Finnegan, A., & Scanzello, C. R. (2012). Synovial fluid from patients with early osteoarthritis modulates fibroblast-like synoviocyte responses to toll-like receptor 4 and toll-like receptor 2 ligands via soluble CD14. *Arthritis and Rheumatism*, 64(7), 2268–2277. <https://doi.org/10.1002/art.34495>

Nikkari, S., Puolakkainen, M., Närvänen, A., Aakre, O., Toivanen, P., & Leirisalo-Repo, M. (2001). Use of a peptide based enzyme immunoassay in diagnosis of *Chlamydia trachomatis* triggered reactive arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 28(11), 2487–2493.

Ospelt, C., Brentano, F., Rengel, Y., Stanczyk, J., Kolling, C., Tak, P. P., Gay, R. E., Gay, S., & Kyburz, D. (2008). Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: Toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 58(12), 3684–3692. <https://doi.org/10.1002/art.24140>

Ostaszewska-Puchalska, I., Zdrodowska-Stefanow, B., Kuryliszyn-Moskal, A., Bułhak-Kozioł, V., & Sokołowska, M. (2015). Incidence of

Chlamydia trachomatis infection in patients with reactive arthritis. *Reumatologia*, 53(2), 69–73. <https://doi.org/10.5114/reum.2015.51505>

Park, Y., Park, S., Yoo, E., Kim, D., & Shin, H. (2004). Association of the polymorphism for Toll-like receptor 2 with type 1 diabetes susceptibility. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1037, 170–174. <https://doi.org/10.1196/annals.1337.028>

Pavlica, L., Drasković, N., Kuljić-Kapulica, N., & Nikolić, D. (2003). Isolation of Chlamydia trachomatis or Ureaplasma urealyticum from the synovial fluid of patients with Reiter's syndrome. *Vojnosanitetski Pregled*, 60(1), 5–10. <https://doi.org/10.2298/vsp0301005p>

Pierer, M., Rethage, J., Seibl, R., Lauener, R., Brentano, F., Wagner, U., Hantzschel, H., Michel, B. A., Gay, R. E., Gay, S., & Kyburz, D. (2004). Chemokine Secretion of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts Stimulated by Toll-Like Receptor 2 Ligands. *The Journal of Immunology*, 172(2), 1256–1265. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.1256>

Pila Pérez R, Pila Peláez R, Holguín Prieto VA, López Peláez L. (2009). *Síndrome de Reiter: Una observación infrecuente*. 13

Roelofs, M. F., Joosten, L. a. B., Abdollahi-Roodsaz, S., van Lieshout, A. W. T., Sprong, T., van den Hoogen, F. H., van den Berg, W. B., & Radstake, T. R. D. J. (2005). The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis and Rheumatism*, 52(8), 2313–2322. <https://doi.org/10.1002/art.21278>

Roelofs, M. F., Wenink, M. H., Brentano, F., Abdollahi-Roodsaz, S., Oppers-Walgreen, B., Barrera, P., van Riel, P. L. C. M., Joosten, L. a. B., Kyburz, D., van den Berg, W. B., & Radstake, T. R. D. J. (2009). Type I interferons might form the link between Toll-like receptor (TLR) 3/7 and TLR4-mediated synovial inflammation in rheumatoid arthritis (RA). *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68(9), 1486–1493. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.086421>

Savic, S., Ouboussad, L., Dickie, L. J., Geiler, J., Wong, C., Doody, G. M., Churchman, S. M., Ponchel, F., Emery, P., Cook, G. P., Buch, M. H., Tooze, R. M., & McDermott, M. F. (2014). TLR dependent XBP-1 activation induces an autocrine loop in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Journal of Autoimmunity*, 50, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.11.002>

Savolainen, E., Kettunen, A., Närvänen, A., Kautiainen, H., Kärkkäinen, U., Luosujärvi, R., & Kaipiainen-Seppänen, O. (2009). Prevalence of antibodies against *Chlamydia trachomatis* and incidence of *C. trachomatis*-induced reactive arthritis in an early arthritis series in Finland in 2000. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 38(5), 353–356. <https://doi.org/10.1080/03009740902769559>

Schnarr, S., Putschky, N., Jendro, M. C., Zeidler, H., Hammer, M., Kuipers, J. G., & Wollenhaupt, J. (2001). *Chlamydia* and *Borrelia* DNA in synovial fluid of patients with early undifferentiated oligoarthritis: Results of a prospective study. *Arthritis and Rheumatism*, 44(11), 2679–2685. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200111\)44:11<2679::aid-art4447>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200111)44:11<2679::aid-art4447>3.0.co;2-c)

Schumacher H. Ralph Jr. Hervé C. Gérard Thurayya K. Araysi José A. Pando Patrick J. Branigan Diego L. Saaibi Alan P. Hudson. (2001). Lower prevalence of *Chlamydia pneumoniae* DNA compared with *Chlamydia trachomatis* DNA in synovial tissue of arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 42(9), 1889–1893.

Sengler, C., Lau, S., Wahn, U., & Nickel, R. (2002). Interactions between genes and environmental factors in asthma and atopy: New developments. *Respiratory Research*, 3(1), 7. <https://doi.org/10.1186/rr179>

Sharma, M., Sharma, S., Sharma, A., & Sharma, K. (2020). *Chlamydia Trachomatis* Associated Reactive Arthritis: A Urinary PCR Based Study. *Indian Dermatology Online Journal*, 11(1), 21–24. https://doi.org/10.4103/idoj.IDOJ_410_19

Siala, M., Gdoura, R., Younes, M., Fourati, H., Cheour, I., Meddeb, N., Bargaoui, N., Baklouti, S., Sellami, S., Rihl, M., & Hammami, A. (2009). Detection and frequency of *Chlamydia trachomatis* DNA in synovial samples from Tunisian patients with reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 55(2), 178–186. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00524.x>

Simpson, A., & Martinez, F. D. (2010). The role of lipopolysaccharide in the development of atopy in humans. *Clinical & Experimental Allergy*, 40(2), 209–223. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03391.x>

Steinke, J., Rich, S., & Borish, L. (2008). 5. Genetics of allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(2), S384–S387. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.07.029>

Tamaki, Y., Takakubo, Y., Hirayama, T., Konttinen, Y. T., Goodman, S. B., Yamakawa, M., & Takagi, M. (2011). Expression of Toll-like Receptors and Their Signaling Pathways in Rheumatoid Synovitis. *The Journal of Rheumatology*, 38(5), 810–820. <https://doi.org/10.3899/jrheum.100732>

Taylor, B. D., Darville, T., Ferrell, R. E., Kammerer, C. M., Ness, R. B., & Haggerty, C. L. (2012). Variants in toll-like receptor 1 and 4 genes are associated with Chlamydia trachomatis among women with pelvic inflammatory disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 205(4), 603–609. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir822>

Tejera B, Grados D, Martinez-Morillo M, Roure S. (2012). *Letter to the Editor*, 8(1), 50–51.

Thuong, N. T. T., Hawn, T. R., Thwaites, G. E., Chau, T. T. H., Lan, N. T. N., Quy, H. T., Hieu, N. T., Aderem, A., Hien, T. T., Farrar, J. J., & Dunstan, S. J. (2007). A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis. *Genes and Immunity*, 8(5), 422–428. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364405>

Torices, S., Julia, A., Muñoz, P., Varela, I., Balsa, A., Marsal, S., Fernández-Nebro, A., Blanco, F., López-Hoyos, M., Martínez-Taboada, V., & Fernández-Luna, J. L. (2016). A functional variant of TLR10 modifies the activity of NFκB and may help predict a worse prognosis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 18(1), 221. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-1113-z>

Tsui, F. W. L., Xi, N., Rohekar, S., Riarh, R., Bilotta, R., Tsui, H. W., & Inman, R. D. (2008). Toll-like receptor 2 variants are associated with acute reactive arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 58(11), 3436–3438. <https://doi.org/10.1002/art.23967>

V. Vila Fayos. (n.d.). Artritis reactivas. In *Enfermedades reumáticas: Actualización SVR*, 79–88. <https://svreumatologia.com/wp-content/uploads/2008/04/Cap-5-Artritis-reactivas.pdf>

Varoga, D., Paulsen, F., Mentlein, R., Fay, J., Kurz, B., Schütz, R., Wruck, C., Goldring, M. B., & Pufe, T. (2006). TLR-2-mediated induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage in septic joint disease. *The Journal of Pathology*, 210(3), 315–324. <https://doi.org/10.1002/path.2059>

Verweij, S. P., Karimi, O., Pleijster, J., Lyons, J. M., de Vries, H. J. C., Land, J. A., Morré, S. A., & Ouburg, S. (2016). TLR2, TLR4 and TLR9 ge-

notypes and haplotypes in the susceptibility to and clinical course of *Chlamydia trachomatis* infections in Dutch women. *Pathogens and Disease*, 74(1), ftv107. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv107>

Wilkinson, Nicola Z. Gabrielle H. Kingsley Joachim Sieper Jürgen Braun Michael E. Ward. (2004). Lack of correlation between the detection of *Chlamydia trachomatis* DNA in synovial fluid from patients with a range of rheumatic diseases and the presence of an antichlamydial immune response. *Arthritis Rheum.* 41(5), 845–854.

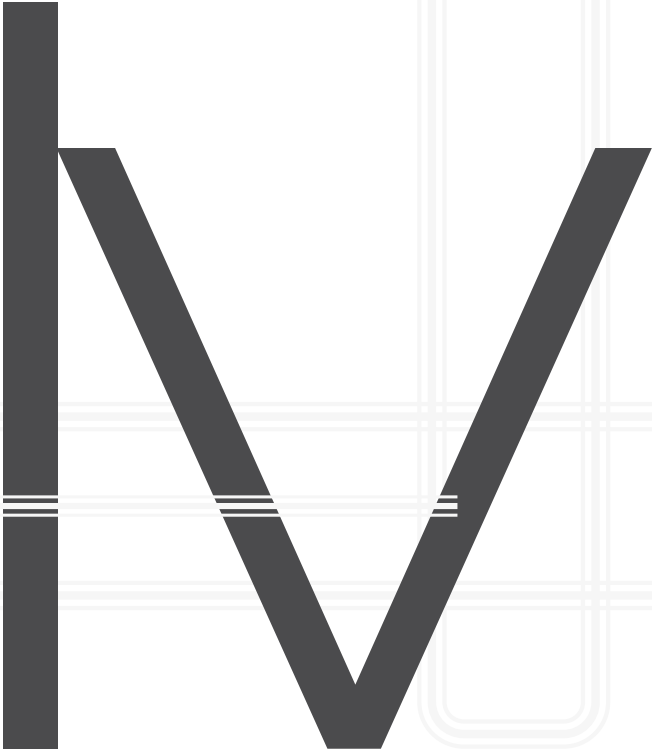
Yang, Z.-X., Liang, Y., Zhu, Y., Li, C., Zhang, L.-Z., Zeng, X.-M., & Zhong, R.-Q. (2007). Increased expression of Toll-like receptor 4 in peripheral blood leucocytes and serum levels of some cytokines in patients with ankylosing spondylitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 149(1), 48–55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03396.x>

Yu, P., Xiao, L., Lin, L., Tang, L., Chen, C., Wang, F., & Wang, Y. (2016). STAT3-mediated TLR2/4 pathway upregulation in an IFN-gamma-induced *Chlamydia trachomatis* persistent infection model. *Pathogens and Disease*, 74(6). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw076>

Zarco Montejo, P. (2012). Diagnosis and treatment of *Chlamydia*-induced reactive arthritis. *Reumatologia Clinica*, 8 Suppl 1, S20-25. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2011.11.003>

Zhang, J., Xu, R., Wu, L., & Jiang, J. (2019). Expression and function of Toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis. *Molecular Medicine Reports*, 20(4), 3565–3572. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10631>

Capítulo



Cepa transgénica TJ356 de *Caenorhabditis elegans* un modelo en toxicología ambiental*

Ruth Mélida Sánchez Mora**

Viviana Andrea Gualteros Bustos***

Martha Gómez Jiménez****

Introducción

En la actualidad se utilizan métodos físicos y químicos para medir el impacto que tienen los tóxicos sobre los recursos no renovables, sin embargo, es necesaria la implementación de modelos biológicos que permitan establecer aproximación más real de los efectos adversos de estos compuestos tóxicos sobre los ecosistemas (Boyd, McBride, Rice, Snyder & Freedman, 2010). En las últimas décadas se han desarrollado estudios empleando al nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) como modelo útil en el monitoreo de tóxicos a

* Texto resultado del proyecto: Análisis del efecto de aguas contaminadas sobre la proteína DAF-16 de la cepa transgénica TJ356 de ***Caenorhabditis elegans*** modelo biológico de contaminación. Aprobado Acuerdo 093 de 2019. Desarrollado por el grupo de investigación: Biotecnología y Genética UCMC

** Doctorado en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Docente. Docente Genética. rmsanchezm@unicolmayor.edu.co

*** Bacterióloga y laboratorista clínica UCMC. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Auxiliar de investigación. Joven Investigadora UCMC. vivis_1894@hotmail.com

**** Maestría en Microbiología (ca). Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Docente. Docente microbiología. marthagomez@unicolamyor.edu.co

nivel ambiental, lo cual amplía los campos de investigación, facilita el análisis y comprensión de los mecanismos de acción de los tóxicos que se pueden encontrar en muestras de agua; además, permite comprender algunos mecanismos de patologías humanas como las enfermedades neurodegenerativas, por su homología con el humano y fácil análisis de sus características fisiológicas (Banse, Blue, Robinson, Jarrett, & Phillips, 2019; Betzel & Bassett, 2017; Zecic, Dhondt, & Braeckman, 2019; Parada-Ferro, *et al.*, 2017).

La cepa transgénica de *C. elegans* TJ356 lleva la proteína GFP fusionada al gen DAF-16 ortólogo del factor de transcripción FOXO, responsable de activar genes involucrados en la supervivencia y las respuestas al estrés oxidativo, en el nematodo, lo que permite evidenciar el efecto tóxico de algunos compuestos. El comportamiento de este nematodo está dado por múltiples mecanismos de señalización y respuesta, entre los cuales son importantes los procesos de síntesis y de liberación de moléculas, así como la integridad celular y las complejas interacciones que ocurren en el organismo; este conjunto de procesos integrados, puede verse afectado por un amplio espectro de sustancias químicas (Anbalagan *et al.*, 2013; Dutilleul, Goussen, Bonzom, Galas, & Reale, 2015; Henderson & Johnson, 2001).

Además, se ha demostrado que los nematodos poseen criterios fenotípicos sensibles comparables con los de otros organismos, que permiten realizar ensayos de toxicidad para analizar los riesgos potenciales de químicos, metales pesados y pesticidas (Ali & Rajini, 2012; Hoss *et al.*, 2013). Actualmente se han diseñado cepas transgénicas de *C. elegans* con genes reporteros que facilitan su utilización en el ámbito de la toxicología ambiental, permitiendo evidenciar los efectos de sustancias a estudiar, como lo son las respuestas al estrés inducidas por pesticidas y extractos orgánicos de los suelos y el agua (Anbalagan *et al.*, 2013; Dutilleul *et al.*, 2015). Un transgénico relevante es la cepa TJ356 que lleva la proteína GFP fusionada a DAF-16 dirigida por 6kb de su promotor (Henderson & Johnson, 2001), lo que permite evaluar el efecto tóxico de compuestos presentes en el suelo y los cuerpos hídricos, por lo cual sería de utilidad para determinar el perfil toxicológico de aguas contaminadas.

Generalidades de *C. elegans*

C. elegans es un nematodo pequeño y de vida libre, propuesto en 1963 por Sydney Brenner al Laboratorio de Biología Molecular del Consejo de Investigación Médica (LMB), desde entonces ha sido utilizado como modelo biológico para comprender el desarrollo y correcto funcionamiento del sistema nervioso. Tiene un ciclo de vida rápido, aproximadamente 3 días a 25 °C, desde el huevo hasta el adulto que pone huevos, y existe principalmente como un hermafrodita autofecundado; aunque los machos se encuentran con una frecuencia <0.2 %, debido a que poseen un número determinado e invariable de células somáticas, ha sido posible esquematizar por completo su linaje celular y realizar los denominados mapas de cableado más completos de cualquier sistema nervioso.

Características del modelo

El modelo *C. elegans* es un nematodo de vía libre perteneciente a la familia *Rhabditidae*, la cepa silvestre es denominada N2 y cuenta con características que lo convierten en un buen modelo para realizar diferentes estudios:

- Posee 959 células somáticas y 302 neuronas.
- Una doble diferenciación sexual: hermafrodita y macho.
- Aproximadamente un milímetro de longitud.
- Posee la capacidad de adaptarse a diversas condiciones en el laboratorio, facilitando su crecimiento sobre placas de Petri en medio Nematode Growth Medium (NGM), en presencia de bacterias *Escherichia coli* OP50 (Zecic *et al.*, 2019).
- Un lapso de vida entre dos y tres semanas.
- Es observable al microscopio óptico (Muñoz, 2014).

- Producción de aproximadamente 300 progenies por autofecundación y hasta 1000 progenies por reproducción cruzada (entre un hermafrodita y un macho).
- Puede colocar de 200 a 300 huevos, que pueden llegar a su fase adulta en dos días.
- Posee aproximadamente 19.000 genes y 97 mega bases en su material genético completamente secuenciado.
- Sus órganos de reproducción (gónadas) son de tamaño considerable permitiendo el análisis de procesos relativos a la organogénesis, proliferación celular, meiosis y embriogénesis (Muñoz, 2014).

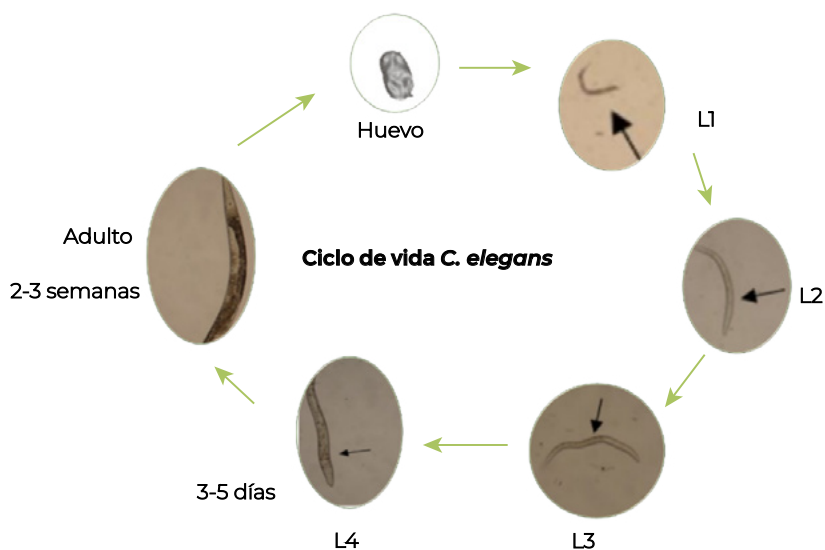
Descripción del ciclo de vida de *C. elegans*

El ciclo de vida de *C. elegans* es un proceso conformado por dos fases principales: embrionaria y post-embrionaria. Es así como 14 horas después de la fertilización, el huevo se abre y procede al desarrollo con cuatro estados larvarios separados por mudas (Boticario & Cascales, 2009). En su etapa de adulto, 131 células mueren por apoptosis, dejando como resultado final 959 células somáticas. Después de realizar un pase la mayor puesta de huevos por parte del nematodo se produce en un lapso de cuatro días y finaliza aproximadamente a los cinco días (Laos, 2011). El ciclo de vida de este nematodo inicia con el apareamiento, ya sea por autofecundación (para los hermafroditas), o copulación entre macho (X0) y hermafrodita (XX); desarrollándose la fase embrionaria.

La fase embrionaria (huevos) tiene una duración de 12-14 horas, con un tamaño de 0,5 um, presentando fase gastrulación y formación de la larva ondulada. La fase larvaria inicia con el estadio L1 caracterizándose por un tamaño corto, presentando órganos diferenciados,

pero funcionalmente inmaduros y poco visibles, luego de 12 horas se desarrolla el estadio L2, el cual manifiesta un aumento de complejidad morfológica. Al cabo de 8 horas inicia el estadio L3, mostrando un desarrollo diferenciado a nivel del sistema reproductivo, siendo visibles la mayoría de órganos. El estadio L4 tiene lugar a las 16 horas, aumentando su longitud, además de la visibilidad del útero donde se desarrollarán los huevos. El nematodo llega a su estadio adulto joven a las 10 horas, siendo fértil y competente a nivel reproductivo durante los primeros 6 días del estadio; siguiendo su etapa de adulto, alcanzando la madurez máxima hasta finalizar el ciclo de vida (Fielenbach & Antebi, 2008). (Figura 1).

Figura 1. Ciclo de vida de *C. elegans*



Se observan la fase embrionaria: desde la fecundación hasta la eclosión del huevo; y la fase post-embrionaria: larva L1 a L2 (duración de 12 horas), Larva L2 a L3 (duración de 8 horas), Larva L3 a L4 (duración de 16 horas), y Larva L4 a adulto (duración de 10 horas). Fotografías tomadas y esquema elaborado por integrantes del Grupo Biotecnología y Genética UCMC.

Desarrollo del sistema nervioso y reproductivo

En el primer estadio de larva L1, con una longitud de 250 μm , se da un mínimo consolidamiento del sistema nervioso, con el establecimiento de cinco clases de neuronas motoras: VAn, VBn, VCn, ASn, VDn a partir de trece (13) precursores (W, P1-P12). Además, cabe resaltar que durante la segunda mitad del estadio, se inician el desarrollo de las gónadas somáticas, a partir de precursores (Z1 y Z4), que dan origen a 12 células en el hermafrodita y 10 células en el macho; los precursores de la línea germinal (Z2 y Z3), inician una serie de divisiones sucesivas (hasta la edad adulta), con el fin que en el estadio L3 y L4 se dé lugar a la vulva (Alberts B, Johnson A, Lewis J, & col., 2002).

El segundo estadio es la larva L2, en el cual el número de divisiones es mínimo, con respecto al sistema nervioso G2, origina dos neuronas del ganglio ventral; en cuanto al sistema reproductor las células “hijas (Z2 y Z3)”, permanecen en continua división hasta llegar aproximadamente a cuadruplicarse (Figura 2). Al final del estadio se inicia reordenamiento celular estableciéndose límites entre las células germinales y somáticas. “La gónada comienza a alargarse, liderada por las células DTC” (Wormatlas, 2015).

Figura 2. Células germinales. Tomada por integrantes del Grupo Biotecnología y genética UCMC



El tercer estadio es la larva L3, en el que el sistema reproductor, conformado por espermatecas, útero y vainas gonadales, se encuentran constituidas por un total de 143 células. La especificidad es mayor en células precursoras vulvares, que al dividirse originan las células vulvares terminales. Los precursores del músculo sexual (mioblasto) se dividen originando 16 células. En la larva macho las gónadas, vesícula seminal y conductos deferentes son constituidos por 53 células somáticas generadas a partir de blastos somáticos específicos (Alberts *et al.*, 2002).

El cuarto estadio es la larva L4, en el cual se complementa la gonadogénesis, los espermatozoides se originan a partir de las células germinales por medio de la diferenciación, al finalizar dicho proceso las demás células germinales sin migrar se diferencian en ovocitos. En las larvas macho los mesoblastos del linaje M dan origen a 41 músculos sexuales. Las células del recto forman la proctodeo que contiene las espículas (Wormatlas, 2015). Finalmente, se genera la punta redonda de la cola característica del adulto.

El último estadio es la larva adulta, el periodo de vida de un adulto normal es de 10-15 días, después de los 3-4 de días fértiles de producir ovocitos (Tabla 1).

Tabla 1. Vida fértil y reproductiva de larvas adultas

Género	Forma de fertilización	Días fértiles y número de progenie
Hermafrodita	Autofertilización	300 progenies
Hermafrodita – macho	Apareamiento macho-hermafrodita	1200-1400 progenies
Macho – hermafrodita	Apareamiento macho-hermafrodita	Apareamiento durante 6 días produce 3000 progenies

Fuente: elaboración propia.

Es característico que se expresen genes exclusivos de cada etapa, permitiendo los cambios fenotípicos específicos como la cutícula lar-

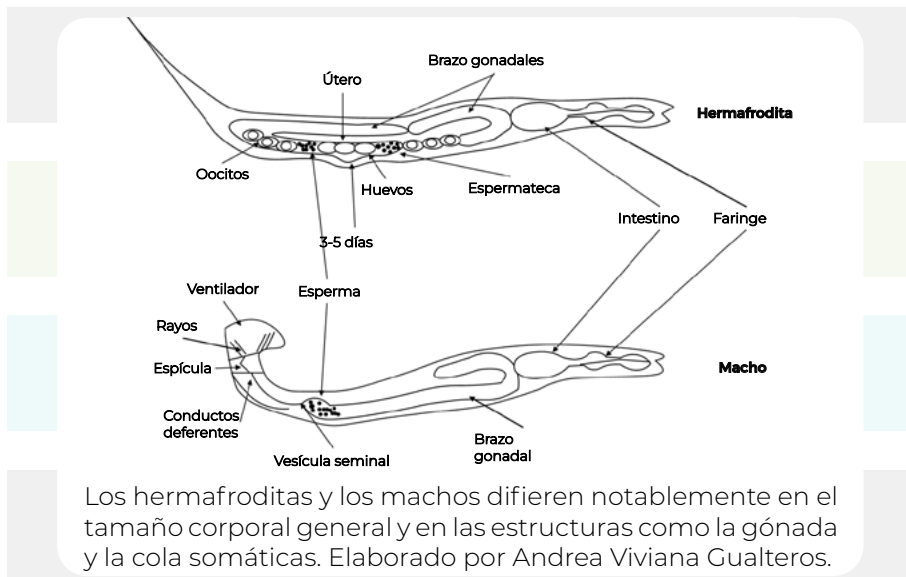
val, característica en cada estadio larval, formación de tejidos y tipos celulares.

Cuerpo de *C. elegans* en machos y hermafroditas

La forma del cuerpo de los adultos, al igual que la de otros nematodos es de forma cilíndrica, no segmentado, que se estrecha hacia los extremos de su cuerpo; posee un tubo exterior y posteriormente un tubo interior separados por un espacio pseudocelómico (Laos, 2011).

La anatomía de los dos sexos del *C. elegans*, difieren en la disposición de la gónada y en la cola, estas diferencias se establecen predominantemente durante el desarrollo post embrionario. La gónada de los *C. elegans* macho es un tubo simple abierto a la cloaca, cerca de la cola; en los *C. elegans* hermafroditas la gónada tiene 2 lóbulos simétricos (uno se extiende hacia la parte anterior y el otro hacia la parte posterior), con abertura simple en el útero, localizado en la vulva (figura 3) (Alberts *et al.*, 2002; Hansen & Pilgrim, 1999).

Figura 3. Ciclo de vida de *C. elegans*



Los hermafroditas y los machos difieren notablemente en el tamaño corporal general y en las estructuras como la gónada y la cola somáticas. Elaborado por Andrea Viviana Gualteros.

C. elegans y toxicología

Los bioensayos de toxicidad en *C. elegans* fueron descritos por Williams *et al.*, en 1990, como pruebas reales para evaluar el deterioro de los ecosistemas; con las cuales se obtienen resultados confiables acerca de la afectación de la estructura y función de los mismos, junto con las consecuencias que presentan los seres vivos que interactúan en el ambiente. Para determinar dicha afectación se hace uso de invertebrados que proporcionan gran cantidad de información toxicológica.

Para calcular la utilidad de *C. elegans* en el estudio de la ecotoxicidad acuática, Williams y colaboradores analizaron 14 sales de metales solubles en agua con alta incidencia producto de los residuos industriales, con el objetivo de determinar la Dosis Letal 50 (DL50) y establecer una base de datos toxicológicos para cada metal y compararlos con documentos de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) (Williams & Dusenbery, 1990), determinando que los metales: mercurio, plomo, cobre, zinc y cadmio pueden inducir una respuesta de estrés liderado por el aumento de β -galactosida, enzima informadora de estrés. Para detectar el aumento de la misma se puede hacer uso de métodos colorimétricos y pruebas histoquímicas que aumentan la sensibilidad de los bioensayos en comparación con las pruebas de letalidad (Peter, Candido, & Jones, 1996).

En 1998 se generaron los primeros gráficos de control de laboratorio en cuanto a pruebas de toxicidad en cuerpos acuáticos haciendo uso del nematodo, los resultados se obtuvieron tras la realización de pruebas de letalidad durante 24 horas y 48 horas, además se restringe el alimento para el grupo de las 24 horas. Los resultados obtenidos determinaron la sensibilidad, reproducibilidad y credibilidad del organismo para evaluación toxicológica; por otra parte, se estandarizó el procedimiento para realizar este tipo de pruebas toxicológicas de 24h y 48h con *C. elegans* (Baer, 1996). El siguiente paso para evaluar las afecciones, que puede presentar el nematodo tras la exposición al tóxico, se determinó en 1999 con Dhawan *et al.*, quienes le dieron un nuevo enfoque a la investigación ecotoxicológica en *C. elegans*, calculando y comparando la supervivencia, reproducción y

comportamiento del mismo; con los resultados obtenidos se pudo precisar que la reproducción y el comportamiento son indicadores de toxicidad mucho más sensibles que la letalidad (Dhawan, Dusenbery & Williams, 1999).

Este nuevo mecanismo de análisis dio la posibilidad de establecer nuevos ensayos entre los cuales Gary *et al.*, en 2002, destacaron crecimiento, alimentación, reproducción y movimiento. Los resultados demuestran que la ingesta de tóxicos vía oral desencadena patologías asociadas al tubo digestivo, que provocan la pérdida del apetito por parte del nematodo y como consecuencia de ello se sugiere la alteración de las pruebas conductuales elegidas para este estudio (Anderson, Boyd & Williams, 2001).

Por otro lado, en 2004, se evaluó el comportamiento locomotor del nematodo enfrentado a tres clases de químicos: pesticidas orgánicos, solventes orgánicos y, metales pesados; la reducción del movimiento se vio afectada o no dependiendo el químico y concentración de exposición. Según las observaciones correspondientes a la reducción del movimiento en el 50 % de la muestra, se determinó que los químicos que reducen el indicador con mayor efectividad eran aquellos considerados como neurotóxicos: levamisol, mebendazol, etanol, acetona y metales pesados (Anderson, Cole & Williams, 2004).

En 2008 se establecieron nuevos puntos de análisis por Harada *et al.*, en los que se incluyen alteración de ultraestructuras, inducción de la proteína del estrés y cambio en la longitud corporal; además se evaluaron los efectos crónicos o a largo plazo de exposición en cuanto a reproducción y crecimiento, ya que los organismos en los ecosistemas mantienen un contacto prolongado o permanente con los tóxicos, los cuales pueden ingresar por medio de la alimentación (Harada, Kurauchi, Hayashi & Eki, 2007).

Luego que Williams *et al.*, determinarán que agentes como el mercurio y plomo inducen una respuesta en el nematodo consecuente a la toxicidad, Du *et al.*, en 2009, corroboraron el daño provocado mediante el seguimiento conductual, poniendo de manifiesto un comportamiento locomotor anormal conocido como encogimiento, lo cual sugiere la afección directa de las neuronas GABAérgicas, ya

que son las encargadas de la sinapsis relacionada con estímulos de movimiento; esto se evidenció con la pérdida de la continuidad axonal visible gracias a la proteína verde fluorescente (Du & Wang, 2009).

En Colombia, Bautista y colaboradores (2004), describieron la problemática medioambiental de las curtiembres ubicadas en el corredor Villapinzón-Chocontá, debido a que están ubicadas 12 kilómetros después del nacimiento del Río Bogotá, convirtiéndose en el primer foco de contaminación; también se presentan las posibles soluciones para resolver la problemática. Para este año el principal problema data de la obtención de cueros poco tecnificados y artesanalmente producidos, sin tener en cuenta el daño ambiental que se genera, por ejemplo, durante los procesos químicos no hay control de dosificación y/o pesaje de insumos, así como el vertimiento de residuos que son arrojados al Río Bogotá, afectando el cuerpo de agua en un 20.6 %, las aguas subterráneas 11.6 % y el aire un 12 % (Bautista, 2004). En vista de los resultados de contaminación se generan estrategias de planeación que tratan de mitigar dicho impacto y organizar el gremio para obtener la legalización del trabajo, los permisos ambientales como consecuencia de la instalación de una planta única de tratamiento de aguas mixtas para todo el sector y el establecimiento del Parque Industrial donde cumplan con la utilización de los Sistemas de Gestión Ambiental Industrial y las normas ISO 14000.

Toxicología ambiental en el modelo de *C. elegans*

La toxicología ambiental ha tomado relevancia desde hace varias décadas, por lo cual el uso de organismos modelos para analizar los efectos de los contaminantes en el medio ambiente se ha convertido en una alternativa útil. Los más empleados son los invertebrados, debido a que los ecosistemas en su mayoría se encuentran conformados por este tipo de organismos, debido a que el 97 % de todas las especies animales son invertebrados (McClellan-Green, Romano & Oberdorster, 2007), además su sistema endocrino tiene rasgos y /

o vías comparables a los observados en organismos superiores, en cuanto a procesos como mecanismos toxico-cinéticos (absorción y eliminación, metabolismo y fisiología) y puntos finales toxicológicos (supervivencia y comportamiento, así como morfología y desarrollo) como lo describen McClellan-Green y colaboradores. (2007).

Uno de los invertebrados más empleados en y toxicología ambiental es el nematodo *C. elegans*, por sus características como su fácil mantenimiento en el laboratorio, corto ciclo de vida, fenotipos observables, fácil manipulación genética y genoma bien caracterizado que permite la detección de objetivos moleculares de toxicidad en el genoma y así evaluar la toxicidad de nuevos productos químicos, como lo establecen Leung y colaboradores (2008).

Para el uso de *C. elegans* en el ámbito de la toxicología se han establecido métodos, que permiten determinar los efectos de los compuestos tóxicos en el fenotipo del nematodo, como la cuantificación de la capacidad reproductiva, la cual tiene correlación con la letalidad en roedores, permitiendo sugerir que este ensayo puede ser útil para predecir la toxicidad potencial de los químicos como lo describen en su estudio Boyd y colaboradores en 2010. También se ha analizado la elaboración de nuevos medios para los estudios de toxicología y nanotoxicología para medir los efectos de los compuestos químicos en el agua y los suelos, debido a que representan mejor la estructura y las condiciones naturales, además de permitir la modificación de parámetros relevantes y ofrecer la posibilidad de realizar estudios de toxicidad en diversas condiciones incluyendo ensayos estables con nanopartículas como ha sido demostrado por Tyne y colaboradores (2013).

C. elegans también ha sido empleado para monitorear la calidad de aguas oceánicas y continentales demostrando gran utilidad. En aguas oceánicas *C. elegans* ha sido empleado para determinar la toxicidad de dispersantes químicos como, por ejemplo, el Corexit 9500 A (compuesto por propilenglicol y dioctil sulfonuccinato de sodio como detergente) utilizado en derrames de petróleo, del cual se ha demostrado que potencia los efectos adversos del petróleo crudo en la reproducción de nematodo *C. elegans*, por medio de la apoptosis de

células germinales inducida por CEP-1, además el anti - apoptótico ced - 9 / Bcl-2 se activa en respuesta al aumento de la muerte celular, como lo describe Bolt (2014).

En aguas continentales *C. elegans* es útil en la determinación de la calidad de agua por medio de análisis eco-toxicológicos que permiten realizar la evaluación integrada de la calidad del agua. En el estudio realizado por Clavijo y colaboradores (2016), fue seleccionada La Cuenca del Río Tunuyán (Provincia de Mendoza, Argentina) como un sistema de control de agua tradicional representativo para probar la aplicabilidad del bioensayo toxicológico con *C. elegans*, permitiendo concluir que los estudios tradicionales de calidad del agua no predicen los posibles efectos tóxicos en los organismos vivos y los bioensayos con el nematodo permiten obtener con mayor exactitud un perfil toxicológico del agua (Clavijo *et al.*, 2016).

En Colombia Tejeda-Benítez y colaboradores (2016), utilizaron *C. elegans* para determinar el perfil toxicológico del Río Magdalena, para esto se evaluaron los sedimentos del río en puntos específicos, determinando la supervivencia, la locomoción y el crecimiento de las cepas de tipo salvaje y transgénicas de *C. elegans*. Los resultados evidenciaron metales pesados (cadmio, plomo, cobre y níquel) en altas concentraciones, además de observarse alteración de la supervivencia, crecimiento, locomoción y expresión génica en los genes *mtl-2*, *sod-4* y *gst-1* del nematodo. Concluyendo que el cadmio y el plomo fueron los metales que se asociaron principalmente con la toxicidad de los sedimentos y, los sitios de muestreo con la mayor alteración en la expresión génica en *C. elegans* fueron Barrancabermeja y Girardot (Tejeda-Benitez, Flegal, Odigie & Olivero-Verbel, 2016).

C. elegans, permite el estudio de los efectos de los metales pesados, como fue demostrado en el estudio de Luz y colaboradores (2017), quienes, mediante análisis de la función mitocondrial como la fisión, la fusión y la mitofagia que son procesos interrelacionados que regulan la forma, el número y el tamaño mitocondrial, así como la actividad metabólica y la respuesta frente a sustancias como los metales pesados, que alteran la función mitocondrial, al afectar los genes que la modulan, los cuales son DRP1 en la fisión, MFN2 y OPA1 en la

fusión y PINK1 y PARK2 en la mitofagia. En los resultados se evidenció que el arsénico interrumpe el metabolismo del piruvato y la actividad del ciclo de Krebs que conlleva al déficit mitocondrial (Luz *et al.*, 2017).

Por las propiedades mencionadas de *C. elegans*, es considerado una especie de nematodos representativa para pruebas de toxicología en aguas dulces como lo estableció Haegerbaeumer y colaboradores en su estudio (2018), en el que fueron comparados diversos nematodos evaluando la sensibilidad al estrés químico, empleando nueve tratamientos químicos diferentes, incluidos los metales y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) durante 48 h. *C. elegans* fue ligeramente menos tolerante a los metales, pero más tolerante a los HAP, lo cual es una respuesta característica de las especies de nematodos de agua dulce (Haegerbaeumer *et al.*, 2018).

Actualmente ha tomado relevancia la epigenética ambiental y *C. elegans* se ha convertido en un modelo para la toxicología ambiental, en particular para el estudio de la genotoxicidad química y la influencia ambiental en el epigenoma; además de permitir el análisis de los estímulos químicos exógenos en la regulación transcripcional, la reprogramación epigenética del desarrollo, la memoria y herencia epigenética; como lo establecen Weinhouse y colaboradores (2018).

Por otro lado, se han elaborado cepas transgénicas de *C. elegans* con proteínas marcadas con GFP útiles en la investigación de respuestas al estrés, inducidas por compuestos tóxicos (como pesticidas y residuos orgánicos) en aguas y suelos, como se evidencia en el estudio realizado por Anbalagan y colaboradores (2013), en el cual son utilizadas 24 cepas con informadores de GFP que representan cuatro vías diferentes de respuesta al estrés en *C. elegans*, se concluyó que los principales tóxicos presentes en estas muestras de agua son de naturaleza metálica y que los extractos orgánicos de suelo tuvieron efectos insignificantes en la expresión de genes y de manera similar, varios pesticidas tuvieron poco efecto en la expresión de un transgén constitutivo *myo-3::GFP* (Anbalagan *et al.*, 2013).

Dentro de las cepas transgénicas informadoras de GFP se encuentra la TJ356, que tiene el gen *daf-16* marcado con GFP y codifica para el factor de transcripción DAF-16, el cual se caracteriza por in-

tervenir y regular respuestas ante procesos de estrés en el nematodo, como lo ha descrito en su estudio Kampkötter y colaboradores (2007), quienes analizaron los efectos protectores de los flavonoides Kaempferol y Fisetina sobre *C. elegans*. Ambos flavonoides aumentaron la supervivencia, redujeron la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular y disminuyeron el estrés oxidativo (Kampkötter et al., 2007). Resultados similares se evidenciaron en el estudio realizado por Havermann y colaboradores (2014), donde se evaluaron los efectos del fenetiléster del ácido cafeico en la acumulación de especies reactivas de oxígeno y la modulación de las vías activas redox SKN-1 y DAF-16 en *C. elegans*. El fenetiléster del ácido cafeico ejerció un fuerte efecto antioxidante, disminuyó los niveles de ROS, incrementó la resistencia al estrés del nematodo contra el estrés térmico y prolongó su vida media; modulando la vía DAF-16 (Havermann, Chovolou, Humpf, & Watjen, 2014).

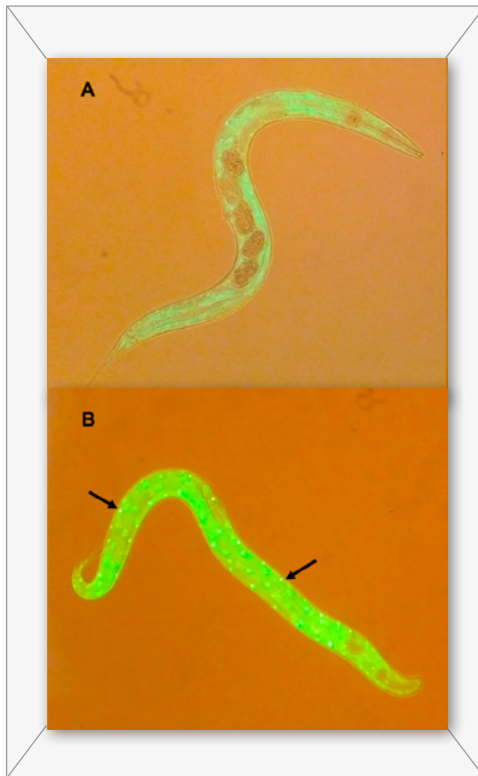
Finalmente, contaminantes tóxicos como el Arsénico, disminuyen significativamente la vida útil, la frecuencia de defecación, favorece la acumulación de lipofuscina intestinal, incrementa peroxidación de lípidos y aumenta los niveles de ROS intracelular de forma dependiente de la edad en *C. elegans*; demostrando que el arsénico acelera el proceso de envejecimiento en el cual el factor de transcripción DAF-16 juega un papel regulador, como lo describe Yu y colaboradores (2016). Por lo cual la cepa TJ356 que permite visualizar el comportamiento de la proteína DAF-16 por medio de fluorescencia, evidencia con mayor claridad los efectos de los compuestos tóxicos en cuerpos hídricos.

Cepa constitutiva TJ356 de *C. elegans*

La cepa transgénica TJ356 de *C. elegans* zIs356 (daf-16::GFP+rol-6), crece, se reproduce lentamente y es más resistente al estrés (Henderson & Johnson, 2001). Transgénico integrado por irradiación gamma extracromosomal (Ex daf-16::GFP). Ésta cepa transgénica tiene el gen daf-16, ortólogo de Forkhead Box Clase O (FOXO) familia de factores

de transcripción (Sanadhya *et al.*, 2018), marcado con GFP. El gen *daf-16* codifica para la proteína DAF-16 que normalmente se localiza en el citosol, en condiciones de estrés (estrés oxidativo principalmente) se activa y es importada al núcleo donde induce la transcripción de genes relacionados con el estrés, metabolismo y longevidad (Figura 4) (Hartwig, Heidler, Moch, Daniel, & Wenzel, 2009; Sobeh *et al.*, 2017).

Figura 4. Localización de la proteína DAF-16 en la cepa TJ356



A. Se observa la localización citosólica de la proteína DAF-16 en condiciones normales. **B.** Las flechas señalan la localización nuclear de la proteína DAF-16 en condiciones de estrés. Fotografías tomadas por los integrantes del Grupo Biotecnología y Genética UCMC.

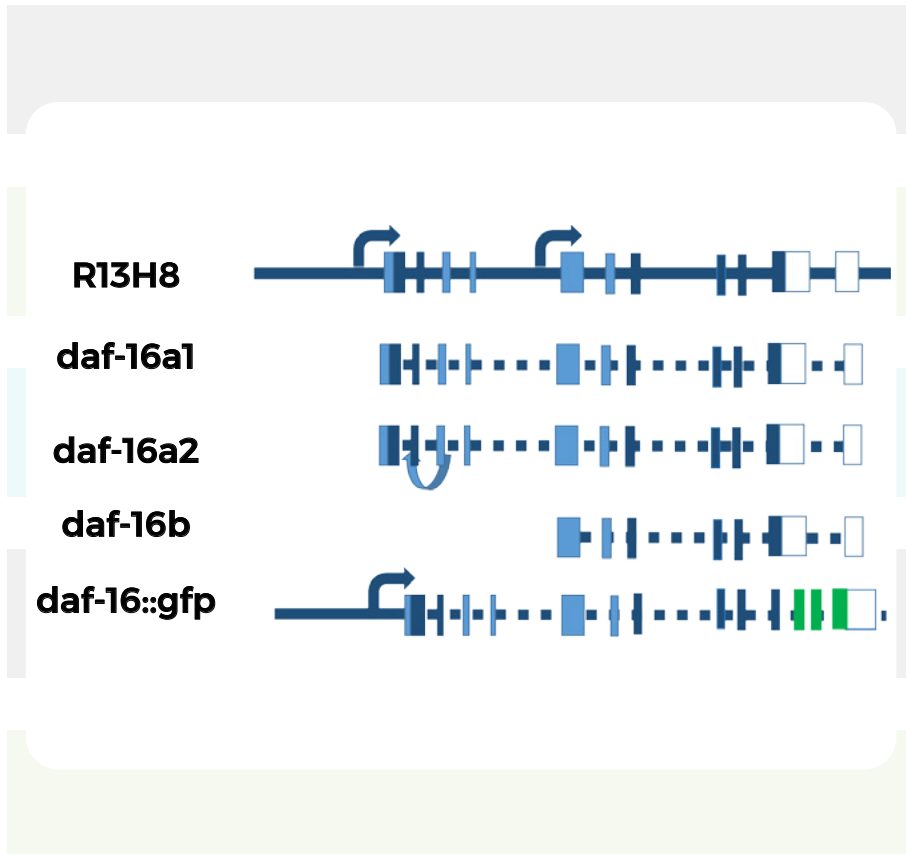
La locomoción en rodillo es una de sus características de esta cepa transgénica, debido a que es portador del alelo dominante *rol-6*, que produce un fenotipo de rodillo, en el cual el gusano retuerce el cuerpo en una hélice diestra, además su desplazamiento es lento, dirigido por la cabeza y la zona anterior de su cuerpo (Figura 5) (Cai, Phong, Fisher, & Wang, 2011; Corsi, Wightman, & Chalfie, 2015; Lin & Chuang, 2017).

Figura 5. Fenotipo rodillo en *C. elegans*. Fotografía tomada por integrantes del Grupo Biotecnología y genética UCMC



Durante el proceso de expresión génica el gen *daf-16* produce tres transcritos diferentes: *a1*, *a2*, y *b*, que codifican un factor de transcripción (Figura 6) (Henderson & Johnson, 2001). Las líneas continuas representan el ADN genómico, las líneas discontinuas representan los intrones empalmados, las cajas blancas representan las regiones no traducidas 5' y 3', las cajas azules claras indican los exones que codifican el dominio de la cabeza de la horquilla y las cajas verdes representan los exones que codifican la proteína fluorescente verde (GFP) (Henderson & Johnson, 2001).

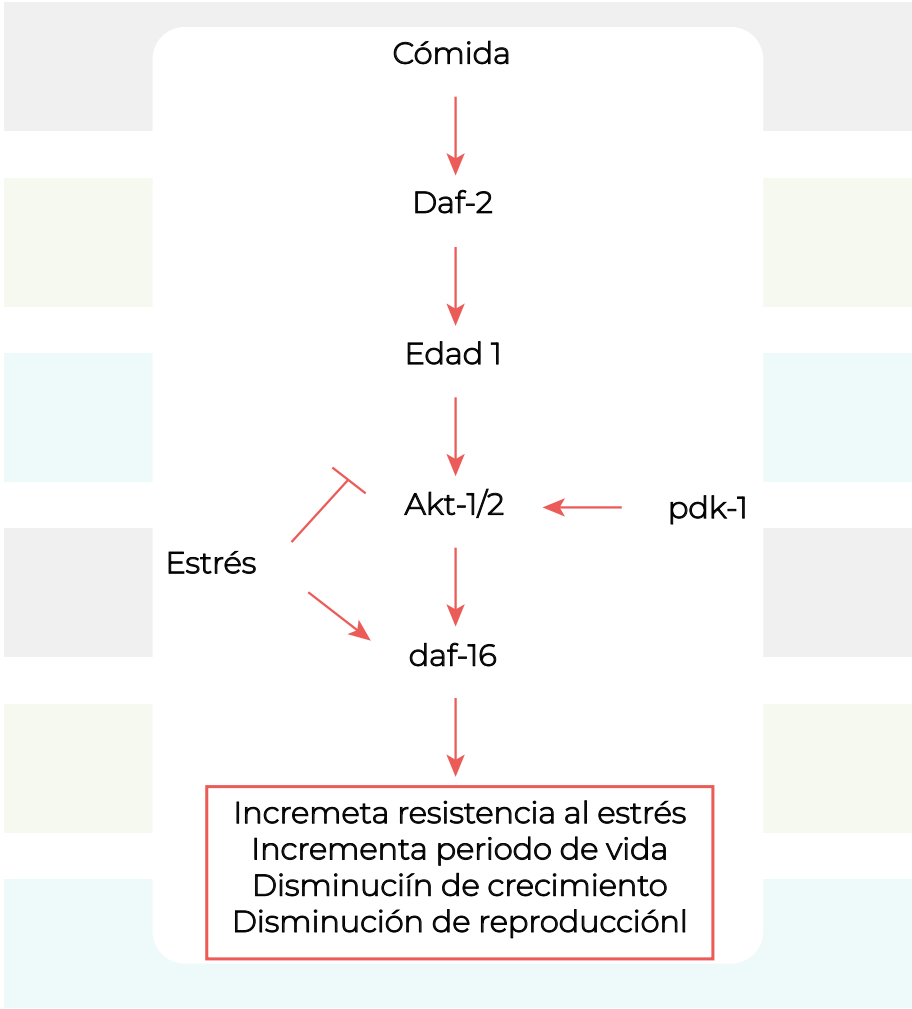
Figura 6. Esquema del gen *daf-16*. Esquema grupo Biotecnología y Genética UCMC



En *C. elegans* *daf-16* está regulado negativamente por una vía de señalización similar a la insulina, por medio de la serina-treonina quinasa AKT / PKB, que fosforila residuos específicos de serina / treonina en proteínas similares a DAF-16; conllevando a la exclusión nuclear y así inhibir la función de DAF-16 (Figura 7) (Henderson & Johnson, 2001).

DAF-16 puede servir como un interruptor para alterar la asignación de recursos en respuesta a un entorno cambiante. La activación de DAF-16 es inhibida por la señalización similar a la insulina en respuesta a la disponibilidad de alimentos. El estrés puede inhibir la señalización similar a la insulina o activar directamente DAF-16 o ambos.

Figura 7. Regulación de daf-16. Esquema grupo Biotecnología y Genética UCMC



En condiciones normales, DAF-16 se localiza en el citosol (favorece la reproducción y el crecimiento), ya que se inhibe su entrada en el núcleo por daf-2 y akt-1 / akt-2, ambos componentes de la señalización similar a la insulina en nematodos (Henderson & Johnson, 2001). Sin embargo, bajo condiciones desfavorables, tales como inanición, calor, estrés oxidativo, obstáculos en el crecimiento o reproducción,

cuando se requiere reparación y mantenimiento celular y/o genético, DAF-16 se traslada al núcleo para iniciar la transcripción de una gran cantidad de genes involucrados en el respuesta al estrés, metabolismo y longevidad; retrasando la reproducción y el crecimiento, al tiempo que aumenta la resistencia al estrés (Henderson & Johnson, 2001; Sanadhya *et al.*, 2018), por lo cual se ha considerado que DAF-16 asigna recursos y modula respuestas ante entornos cambiantes (Henderson & Johnson, 2001).

DAF-16 :: GFP es visible desde la etapa embrionaria antes de la eclosión y así permanece durante todo el ciclo de vida del nematodo, expresándose en todas las células (predominante en células neuronales) con excepción a las que componen la faringe (Henderson & Johnson, 2001). Se ha descrito que DAF-16 contribuye a la prevención o reparación del daño macromolecular oxidativo, al ser esencial para la expresión máxima de HSP-16, *ctl-1*, *ctl-2* (isoformas de catalasa) y *sod-3* para una Superóxido Dismutasa (SOD) (Hartwig *et al.*, 2009).

En los procesos de estrés de *C. elegans* se caracteriza la intervención de las proteínas de choque térmico (HSP), específicamente HSP-16.2, la cual ha permitido determinar la capacidad de soportar estrés térmico por parte del nematodo, pues se ha sugerido que su mecanismo de acción se basa en reducir el estrés al incrementar la concentración de glutatión reducido (GSH) por medio del aumento de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en la generación NADPH a través de la GSSG-reductasa como modulador redox. Además se ha identificado que la función de HSP-16.2 en la resistencia al estrés se encuentra involucrado en la vía de señalización de insulina / IGF-1, la cual es determinante de la longevidad en *C. elegans* (Hartwig *et al.*, 2009).

Conclusiones

C. elegans por sus versátiles características es sensible a la exposición de una gran gama de sustancias, adoptando cambios que son perceptibles a nivel fisiológico y pueden ser detectados desde la experimentación básica como la observación, hasta ámbitos de alta

complejidad como proteómica, metabolómica y epigenética. Adicionalmente, el surgimiento de cepas transgénicas que evidencian cambios fisiológicos y en la expresión génica por medio de reporteros unidos a genes o proteínas de interés, facilitan la identificación en menor tiempo de las alteraciones generadas durante la exposición del nematodo a diversas sustancias y metabolitos. Teniendo en cuenta los criterios mencionados, *C. elegans* y sus cepas transgénicas como la TJ356 son útiles como modelo de investigación in vivo en toxicología ambiental, en la cual se incluye el análisis de suelos, sedimentos y cuerpos hídricos.

Referencias bibliográficas

Alberts B., Johnson A., Lewis J., & col., y. (2002). Molecular Biology of the Cell. En G. Science (Ed.). Garland Science.

Ali, S. J., & Rajini, P. S. (2012). Elicitation of dopaminergic features of Parkinson's disease in *C. elegans* by monocrotophos, an organophosphorous insecticide. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 11(8), 993-1000. doi: 10.2174/1871527311211080008

Anbalagan, C., Lafayette, I., Antoniou-Kourounioti, M., Gutierrez, C., Martin, J. R., Chowdhuri, D. K., & De Pomerai, D. I. (2013). Use of transgenic GFP reporter strains of the nematode *Caenorhabditis elegans* to investigate the patterns of stress responses induced by pesticides and by organic extracts from agricultural soils. *Ecotoxicology*, 22(1), 72-85. doi: 10.1007/s10646-012-1004-2

Anderson, G. L., Boyd, W. A., & Williams, P. L. (2001). Assessment of sublethal endpoints for toxicity testing with the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Chem*, 20(4), 833-838.

Anderson, G. L., Cole, R. D., & Williams, P. L. (2004). Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Chem*, 23(5), 1235-1240. doi: 10.1897/03-264

Baer, K. N. (1996). Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. *Journal of the American College of Toxicology*, 15(5), 453-454. doi: 10.1177/109158189601500514

Banse, S. A., Blue, B. W., Robinson, K. J., Jarrett, C. M., & Phillips, P. C. (2019). The Stress-Chip: A microfluidic platform for stress analysis in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, *14*(5), e0216283. doi: 10.1371/journal.pone.0216283

Bautista, J. I. (2004). Las curtiembres del corredor Villapinzón-Chocontá y el Río Bogotá. *Revista Facultad de Ciencias Económicas: Investigación y Reflexión*, *XII*, 36-45.

Betzel, R. F., & Bassett, D. S. (2017). Generative models for network neuroscience: prospects and promise. *J R Soc Interface*, *14*(136). doi: 10.1098/rsif.2017.0623

Bolt, H. M. (2014). Fighting oil spills at sea and toxicology of complex mixtures. *Arch Toxicol*, *88*(3), 541-542. doi: 10.1007/s00204-014-1202-1

Boticario, B. C., & Cascales, A. M. (2009). *Innovaciones en Cáncer*. Editorial UNED..

Boyd, W. A., McBride, S. J., Rice, J. R., Snyder, D. W., & Freedman, J. H. (2010). A high-throughput method for assessing chemical toxicity using a *Caenorhabditis elegans* reproduction assay. *Toxicol Appl Pharmacol*, *245*(2), 153-159. doi: 10.1016/j.taap.2010.02.014

Caenorhabditis elegans as a genetic organism (2015). Wormatlas.

Cai, L., Phong, B. L., Fisher, A. L., & Wang, Z. (2011). Regulation of fertility, survival, and cuticle collagen function by the *Caenorhabditis elegans* eaf-1 and ell-1 genes. *J Biol Chem*, *286*(41), 35915-35921. doi: 10.1074/jbc.M111.270454

Clavijo, A., Kronberg, M. F., Rossen, A., Moya, A., Calvo, D., Salatino, S. E.,... Munarriz, E. R. (2016). The nematode *Caenorhabditis elegans* as an integrated toxicological tool to assess water quality and pollution. *Sci Total Environ*, *569-570*, 252-261. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.057

Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *200*(2), 387-407. doi: 10.1534/genetics.115.176099

Dhawan, R., Dusenbery, D. B., & Williams, P. L. (1999). Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Toxicol Environ Health A*, *58*(7), 451-462. doi: 10.1080/009841099157179

Du, M., & Wang, D. (2009). The neurotoxic effects of heavy metal exposure on GABAergic nervous system in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 27(3), 314-320. doi: 10.1016/j.etap.2008.11.011

Dutilleul, M., Goussen, B., Bonzom, J. M., Galas, S., & Reale, D. (2015). Pollution breaks down the genetic architecture of life history traits in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, 10(2), e0116214. doi: 10.1371/journal.pone.0116214

Fielenbach, N., & Antebi, A. (2008). *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes Dev*, 22(16), 2149-2165. doi: 10.1101/gad.1701508

Haegerbaeumer, A., Hoss, S., Heininger, P., & Traunspurger, W. (2018). Is *Caenorhabditis elegans* representative of freshwater nematode species in toxicity testing? *Environ Sci Pollut Res Int*, 25(3), 2879-2888. doi: 10.1007/s11356-017-0714-7

Hansen, D., & Pilgrim, D. (1999). Sex and the single worm: sex determination in the nematode *C. elegans*. *Mech Dev*, 83(1-2), 3-15.

Harada, H., Kurauchi, M., Hayashi, R., & Eki, T. (2007). Shortened lifespan of nematode *Caenorhabditis elegans* after prolonged exposure to heavy metals and detergents. *Ecotoxicol Environ Saf*, 66(3), 378-383. doi: 10.1016/j.ecoenv.2006.02.017

Hartwig, K., Heidler, T., Moch, J., Daniel, H., & Wenzel, U. (2009). Feeding a ROS-generator to *Caenorhabditis elegans* leads to increased expression of small heat shock protein HSP-16.2 and hormesis. *Genes Nutr*, 4(1), 59-67. doi: 10.1007/s12263-009-0113-x

Havermann, S., Chovolou, Y., Humpf, H. U., & Watjen, W. (2014). Caffeic acid phenethyl ester increases stress resistance and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulation of the insulin-like DAF-16 signalling pathway. *PLoS One*, 9(6), e100256. doi: 10.1371/journal.pone.0100256

Henderson, S. T., & Johnson, T. E. (2001). *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*, 11(24), 1975-1980.

Hoss, S., Menzel, R., Gessler, F., Nguyen, H. T., Jehle, J. A., & Traunspurger, W. (2013). Effects of insecticidal crystal proteins (Cry proteins)

produced by genetically modified maize (Bt maize) on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Pollut*, 178, 147-151. doi: 10.1016/j.envpol.2013.03.002

Kampkotter, A., Gombitang Nkwonkam, C., Zurawski, R. F., Timpel, C., Chovolou, Y., Watjen, W., & Kahl, R. (2007). Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Arch Toxicol*, 81(12), 849-858. doi: 10.1007/s00204-007-0215-4

Laos, F. A. S. (2011). Evaluación de la actividad de flavonoides y sus metabolitos en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. Universidad de Salamanca.

Leung, M. C., Williams, P. L., Benedetto, A., Au, C., Helmcke, K. J., Aschner, M., & Meyer, J. N. (2008). *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol Sci*, 106(1), 5-28. doi: 10.1093/toxsci/kfn121

Lin, L. C., & Chuang, H. S. (2017). Analyzing the locomotory gaitprint of *Caenorhabditis elegans* on the basis of empirical mode decomposition. *PLoS One*, 12(7), e0181469. doi: 10.1371/journal.pone.0181469

Luz, A. L., Godebo, T. R., Smith, L. L., Leuthner, T. C., Maurer, L. L., & Meyer, J. N. (2017). Deficiencies in mitochondrial dynamics sensitize *Caenorhabditis elegans* to arsenite and other mitochondrial toxicants by reducing mitochondrial adaptability. *Toxicology*, 387, 81-94. doi: 10.1016/j.tox.2017.05.018

McClellan-Green, P., Romano, J., & Oberdorster, E. (2007). Does gender really matter in contaminant exposure? A case study using invertebrate models. *Environ Res*, 104(1), 183-191. doi: 10.1016/j.envres.2006.09.008

Muñoz, M. (2014). *Seres modélicos entre la naturaleza y el laboratorio*. Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CSIC-UPO) / Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Parada-Ferro, L. K., et al., (2017). Phenotypic characterization of the N2 strain of *Caenorhabditis elegans* as a model in neurodegenerative diseases. *Nova*, 15(28), 69-78

Peter, E., Candido, M., & Jones, D. (1996). Transgenic *Caenorhabditis elegans* strains as biosensors. *Trends in Biotechnology*, 14(4), 125-129. doi: [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)10016-0](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10016-0)

Sanadhya, P., Bucki, P., Liarzi, O., Ezra, D., Gamliel, A., & Braun Miya-
ra, S. (2018). *Caenorhabditis elegans* susceptibility to *Daldinia* cf. *con-*
centrica bioactive volatiles is coupled with expression activation of the
stress-response transcription factor *daf-16*, a part of distinct nematocidal
action. *PLoS One*, 13(5), e0196870. doi: 10.1371/journal.pone.0196870

Sobeh, M., Mahmoud, M. F., Hasan, R. A., Cheng, H., El-Shazly, A.
M., & Wink, M. (2017). *Senna singueana*: Antioxidant, Hepatoprotective,
Antiapoptotic Properties and Phytochemical Profiling of a Methanol
Bark Extract. *Molecules*, 22(9). doi: 10.3390/molecules22091502

Tejeda-Benitez, L., Flegal, R., Odigie, K., & Olivero-Verbel, J. (2016).
Pollution by metals and toxicity assessment using *Caenorhabditis*
elegans in sediments from the Magdalena River, Colombia. *Environ*
Pollut, 212, 238-250. doi: 10.1016/j.envpol.2016.01.057

Tyne, W., Lofts, S., Spurgeon, D. J., Jurkschat, K., & Svendsen, C.
(2013). A new medium for *Caenorhabditis elegans* toxicology and na-
notoxicology studies designed to better reflect natural soil solution
conditions. *Environ Toxicol Chem*, 32(8), 1711-1717. doi: 10.1002/etc.2247

Weinhouse, C., Truong, L., Meyer, J. N., & Allard, P. (2018). *Caenor-*
habditis elegans as an emerging model system in environmental epi-
genetics. *Environ Mol Mutagen*, 59(7), 560-575. doi: 10.1002/em.22203

Williams, P. L., & Dusenbery, D. B. (1990). Aquatic toxicity testing
using the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Chem*,
9(10), 1285-1290. doi: 10.1002/etc.5620091007

Yu, C. W., How, C. M., & Liao, V. H. (2016). Arsenite exposure ac-
celerates aging process regulated by the transcription factor DAF-16/
FOXO in *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*, 150, 632-638. doi:
10.1016/j.chemosphere.2016.01.004

Zecic, A., Dhondt, I., & Braeckman, B. P. (2019). The nutritional re-
quirements of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Nutr*, 14, 15. doi:10.1186/
s12263-019-0637-7

