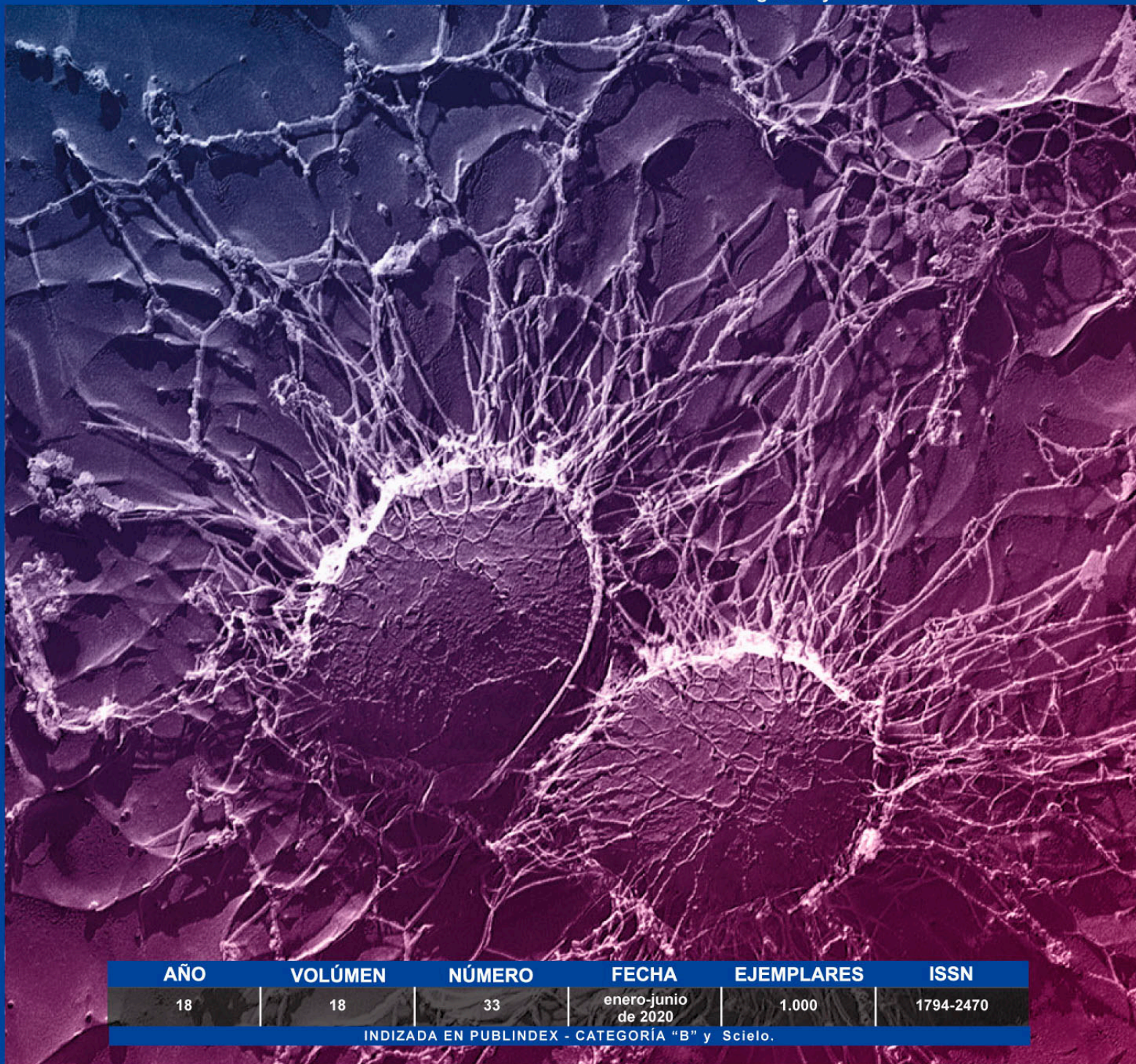


Publicación científica en ciencias naturales, biológicas y médicas

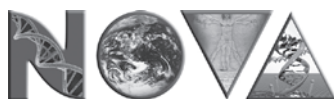


AÑO	VOLÚMEN	NÚMERO	FECHA	EJEMPLARES	ISSN
18	18	33	enero-junio de 2020	1.000	1794-2470
INDIZADA EN PUBLINDEX - CATEGORÍA "B" y Scielo.					

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA ● UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA

Registrada en LILACS de la plataforma BIREME, LATINDEX, E-revistas, Informe, EBSCO, Mediciatina, Fuente Académica, IMBIOMED, Actualidad Iberoamericana e Index Copernicus.





**NOVA Publicación Científica  
en Ciencias Biomédicas**

Volúmen 18 Número 33

<b>Objetivo</b>	Difundir trabajos originales e inéditos que contribuyan a ampliar los conocimientos en las ciencias biomédicas	
<b>Ámbito temático</b>	Ciencias biológicas y ciencias médicas	
<b>Público objetivo</b>	Investigadores y especialistas en el área biomédica	
<b>Periodicidad</b>	Publicación semestral; enero-junio; julio-diciembre	
<b>Indizada en</b>	Publindex - B Scielo REDALYC	
<b>Registrada en Bases de Datos Académicos</b>	LILACS de la plataforma BIREME E-revistas EBSCO Fuente Académica Actualidad Iberoamericana	LATINDEX Informe Mediclatina IMBIOMED Index Copernicus



NOVA está licenciada con creative Commons

<b>Registro ISSN</b>	17942470
<b>Dirección postal</b>	Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca-UNICOLMAYOR Calle 28 No 5B-02 Bogotá, D.C-Colombia Universidad Nacional Abierta y a Distancia- UNAD- Sede Nacional. Calle 14 Sur No 14-23 Bogotá, D.C- Colombia
<b>Dirección electrónica</b>	<a href="http://www.unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/">http://www.unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/</a>
<b>Teléfonos</b>	UNICOLMAYOR: (+57)1 2418800 Ext 132-133 UNAD: (+57)1 3443700

# NOVA en OJS

La revista *NOVA* entra a ser parte de las publicaciones científicas de *Acceso Abierto* por medio del sistema de administración y publicación de revistas y documentos periódicos en internet *Open Journal System* -OJS-. Este sistema está diseñado para reducir el tiempo y energías dedicadas al manejo exhaustivo de las tareas que involucra la edición de una publicación seriada, permitiendo un manejo eficiente y unificado del proceso editorial. Con esto se busca acelerar el acceso en la difusión de contenidos e investigaciones científicas producidas dentro y fuera de la universidad en los temas relacionados con las ciencias biomédicas.

OJS, es un software desarrollado por Public Knowledge Project – PKP- de la Facultad de Educación de la University of British Columbia, utilizado ahora por la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, dentro de un proceso liderado, con el apoyo de la oficina de investigaciones, por la editora de la revista *NOVA* Olga Lucía Ostos y el ingeniero Camilo Andrés Angulo Muñoz -diseñador, y gestor de la plataforma y editor de textos en formato HTML y EPUB-. En el siguiente enlace podrán tener acceso a la plataforma *Open Journal System* de *NOVA* y a los documentos en PDF, HTML y EPUB allí disponibles, así mismo, encontrarán las normas para los autores, la sección de registro, donde los autores pueden inscribirse para hacer envío de sus artículos, y las bases e índices bibliográficos a las que pertenece la revista.  
<http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/>

## Editora

Olga Lucía Ostos Ortiz Bsc, Msc, MPA.

## Editor Asociado

Helena Frayle Salamanca, Msc.

## Asistente Editorial

Douglas Niño, Dr.  
Johanna Lizeth González Devia, Msc.

## Open Journal System

Carlos Alberto Rodríguez Sánchez, Msc.

## Comité Editorial

### 1. Luis Alejandro Barrera

PhD en Bioquímica, Magister en Ciencias,  
Director Instituto de Errores Innatos del Metabolismo Pontificia Universidad Javeriana.

### 2. Julio Delgado

PhD. Director de la Escuela de Biotecnología.  
Universidad de San Martín de Panamá.

### 3. Luis Alberto Gómez Grosso

PhD. Director Laboratorio de Fisiología Molecular Instituto Nacional de Salud.

### 4. Genoveva Keyeux

Doctorado en Biologie Moléculaire Cellulaire Et Biochimie, Magister en  
Deuxième Licence En Sciences Equivalencia Dea.  
Docente- Investigador Universidad Nacional de Colombia.

### 5. Manuel Alfonso Patarroyo

Doctorado en Química con énfasis en Bioquímica. Investigador Fundación  
Instituto de inmunología de Colombia FIDIC.

### 6. Raul Poutou Piñales

Doctorado en Ciencias Biológicas, Magister en Microbiología, Profesor  
Asociado Pontificia Universidad Javeriana.

### 7. Hugo Hernando Vega Fajardo

Doctorado en Ciencias Médicas, MD, Magister en Genética Humana,  
Profesor Universidad Nacional de Colombia.

### 8. Joaquín Benavides López De Mesa

Biólogo, Magister en Microbiología.  
Docente Investigador Universidad de la Salle.

### 9. Orlando Acosta Losada

MD, Magister en Genética Humana, PhD en Virología Molecular. Profesor  
Asociado Universidad Nacional de Colombia.

### 10. Moises Wasserman

PhD en Bioquímica. Rector de la Universidad Nacional de Colombia,  
Director del Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica LIBIQ  
Universidad Nacional de Colombia.

### 11. Hugo Mendieta Zerón

Doctor en Endocrinología.  
Universidad Autónoma del Estado de México. México.

### 12. Magnolia Matilde Correa Muñoz

Doctor en Ciencias (Biotecnología).  
Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Universidad Autónoma  
de Baja California, México.

### 13. Andrés Felipe López Gerena

Biólogo, Master en Monitorización de Ensayos Clínicos. Colegio Oficial de  
Médicos de Barcelona. Barcelona, España

### 14. Maria Jesus Tuñón González

Bióloga y doctora del departamento de Ciencias Biológicas e Instituto de  
Biomedicina, Universidad de León. España

### 15. Javier del Angel Caraza

Doctor en Medicina y Cirugía Animal  
Universidad Autónoma del Estado de México

### 16. Oscar Orlando Bernal Parra

Doctor en Ciencias  
Universidad de California, Riverside



# Contenido / Content

---

## Editorial / Editorial

5

---

## Artículo producto de la investigación / Article product of the research

### Identificación de acciones de salud en el Programa de Control de Sífilis en gestantes, Cartagena de Indias, 2016

9

Identification of Health Actions in the Syphilis Control Program in Pregnant Women, Cartagena de Indias, 2016

Elvisa Cárdenas Dávila, Elías Alberto Bedoya Marrugo, Yuri Arnold Domínguez, Elin Manrique-Julio

### Perspectivas en investigación: células HEp-2 infectadas con EB's de *Chlamydia trachomatis* serovar 2 (VR-902B)

21

HEp-2 Cells Infected with EB's from *Chlamydia trachomatis* serovar 2 (VR-902B): Research Perspectives

Natalia Castellanos Hernández, Yessica Marcela Castañeda Franco, Paola Andrea Caro Burgos, Ruth Mélida Sánchez Mora

### Detección de un mosaico de trisomía 21 en líquido amniótico

35

Detection of a mosaicism of trisomy 21 in amniotic liquid

María Paula Prieto, María Ximena Arteaga, Isabel Fernandez, Sharon Lechtig, Carolina Ciro, Valentina Maldonado, Luis Gustavo Celis

### Caracterización geométrica euclidiana y fractal de células falciformes

43

Geometric euclidean and fractal characterization of sickle cells

Javier Oswaldo Rodríguez-Velásquez, Martha Leonor Castillo-Bohórquez, Ana Lucía Oliveros-Rozó, María-Yolanda Soracipa-Muñoz, Signed Esperanza Prieto-Bohórquez

### Actividad *in vitro* de los extractos etanólicos de *Lantana camara* L., *Petiveria alliacea* L. y *Lippia dulcis* T. frente a bacterias patógenas

53

*In vitro* activity of the ethanolic extracts from *Lantana camara* L., *Petiveria alliacea* L. and *Lippia dulcis* T. against pathogenic bacteria

Nahir Alejandra Navarrete Barragán, Erika Fadime Pita-Ospina, Ruth Mélida Sánchez Mora, Sara Emilia Giraldo Quintero, María Consuelo Bernal Lizarazú



---

**Artículo de revisión / Review article****Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología****73**

Physicochemical Principles of dyes used In Microbiology

Lucía Constanza Corrales Ramírez, Liliana Caycedo Lozano

---

**Artículo corto / Short article****Características bacteriológicas, físicas y pH del agua de consumo humano del municipio de Une-Cundinamarca****101**

Bacteriological and physical characteristics and pH of water for human consumption in the municipality of Une-Cundinamarca

Sandra Mónica Estupiñán-Torres, Sara Lilia Ávila de Navia, Diego Barrera Aguirre, Robinson Baquero Torres, Delith Allexandra Díaz Ibañez, Anthony Hever Rodríguez Ramírez

**Calidad bacteriológica del agua del humedal Gualí-Tres Esquinas, Funza, Cundinamarca****113**

Bacteriological quality of the water of the Guali-Tres Esquinas Wetland, Funza, Cundinamarca

Sandra Mónica Estupiñán-Torres, Anyi Jiobana Cepeda Ruge, Adriana Marcela Hurtado Díaz, Karen Dayana Vega Pinzón

---

**Políticas del editorial / Editorial Policies****123**

## Editorial

---

Las ciencias biomédicas, a través de los siglos, han experimentado importantes cambios, pasando de escenarios descriptivos, a espacios cuantitativos, analíticos y protocolos, utilizando cada vez metodologías de estudio más rigurosas y datos reproducibles. El surgimiento de ciencias como la bioquímica, la biotecnología, la biología molecular y otras áreas de especialización del conocimiento permiten conocer cada vez más, con mayor precisión, el ser humano y su entorno, así como diagnosticar mejor diferentes enfermedades y, en algunos casos, proponer tratamientos personalizados para los pacientes.

La humanidad ha avanzado en la interpretación de los procesos biológicos, mediante la comprensión de las interacciones con mayores niveles de complejidad. Importantes acontecimientos como la secuenciación de diversos organismos, incluido el ser humano, la descripción y el conocimiento de las proteínas que allí se expresan, así como el estudio a detalle de lo que conocemos como el dogma central de la biología molecular: ADN se transcribe a ARN y una forma de este, el ARN mensajero, da lugar a la síntesis de proteínas han generado importantes avances en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Sin embargo, aunque se conocen cada vez a mayor profundidad los detalles de la regulación de la expresión génica, la clave de cómo se pliegan las proteínas sigue sin conocerse y este hecho hace que las proteinopatías, enfermedades causadas por plegamiento defectuoso y no funcional de las proteínas siga siendo un tema desconocido. Como esta, muchas otras enfermedades y procesos son temas permanentes de estudio y permiten el avance en el conocimiento de la biología celular.

Así mismo, en el último siglo se han dado avances importantes en el conocimiento de las células precursoras o células madre que tras diversas modificaciones dan lugar a las células maduras y se han podido desarrollar protocolos para diferenciar células madre de origen embrionario humano en diferentes tipos celulares: tejido muscular, tejido nervioso, etc lo que ha significado pensar en temas como la regeneración celular. Por otra parte, también han surgido interesantes estudios en temas como la reprogramación celular, con experimentos que han consistido en revertir la diferenciación de células maduras, de tejidos específicos, a células madre embrionarias, mediante la expresión de los factores de transcripción especializados. Estos hallazgos son esperanzadores en la cura de enfermedades



como la enfermedad de Parkinson, donde fibroblastos reprogramados podrían generar una recuperación funcional. Así mismo, el uso de células madre provenientes de células de cordón umbilical han sido una novedosa alternativa como terapia celular para el tratamiento de enfermedades como leucemias o hemoglobinopatías.

Es importante resaltar el papel de las revistas científicas para dar a conocer estos y otros descubrimientos y contribuir al avance del conocimiento. La Revista NOVA realizó un estudio, utilizando herramientas de vigilancia tecnológica, y se identificaron 6 temáticas relevantes para la publicación: 1. enfermedades infecciosas y resistencia bacteriana; 2. enfermedades raras y neurodegenerativas; 3. enfermedades tropicales; 4. enfermedades metabólicas y diagnóstico prenatal; 5. enfermedades cardiovasculares y hematológicas, 6. biotecnología y calidad del agua.

Gracias a los autores, pares evaluadores, equipo editorial e Instituciones Editoras, la Revista NOVA en sus 18 años de existencia ha contribuido a la divulgación del conocimiento, al fortalecimiento de la cultura de la ciencia, la tecnología y la innovación en el país y se ha convertido en un referente de calidad editorial, académica, visibilidad e impacto en el área de ciencias biomédicas.

En esta oportunidad, la Revista *NOVA* pone a disposición del público lector 8 interesantes artículos. El primero de estos se titula “*Identificación de acciones de salud en el programa de control de sífilis en gestantes, Cartagena de Indias, 2016.*”, elaborado por los investigadores Elvisa Cardenas Dávila, Elias Alberto Bedoya Marrugo, Yuri Domínguez y Elin Manrique-Julio, de la Fundación Universitaria Tecnológico Comfenalco, Universidad de Ciencias Médicas de La Habana y Universidad de Cartagena, quienes identificaron el cumplimiento de acciones de salud comprendidas en el Programa de Control de Sífilis en gestantes de la ciudad de Cartagena de Indias, primer semestre del 2016. Su estudio concluye que, el control de la sífilis durante la atención prenatal fue deficiente con una alta tasa de no adherencia a las recomendaciones médicas.

En el segundo artículo, los investigadores Natalia Castellanos Hernández, Yessica Marcela Castañeda Franco, Paola Andrea Caro Burgos y Ruth Melida Sánchez Mora, de la Dirección de Sanidad, Ejército Nacional de Colombia y a Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, en su artículo “*Perspectivas en investigación: Células hep-2 infectadas con EB's de Chlamydia trachomatis serovar 2 (vr-902b)*”, optimizan el modelo de infección de *C. trachomatis* en células HEp-2 con cuerpos elementales (EB's) de *C. trachomatis* serovar L2, analizan la infección con la técnica de inmunofluorescencia directa que detecta la proteína de membrana MOMP de *C. trachomatis*. Tras los ensayos realizados se evidenció la

presencia de cuerpos elementales próximos y dentro del citoplasma celular, así como células vacuoladas y daño celular causado por la infección.

El tercer artículo presentado por los investigadores Maria Paula Prieto Soler, Maria Ximena Arteaga Pichardo, Isabel Fernández, Sharon Lechtig, Carolina Maria Ciro, Valentina Maldonado y Luis Gustavo Celis, de la Universidad de La Sabana – Bogotá, Colombia y la Unidad de Genética Médica de la Policlínica Metropolitana - Caracas, Venezuela., presentan su artículo titulado “*Detección de un mosaico de trisomía 21 en líquido amniótico*”, en el cual presentan los resultados del análisis de una alteración cromosómica tomada de una base de datos conformada por un total de 4755 muestras de líquido amniótico, extraídas mediante amniocentesis con indicación de su médico tratante, por edad materna avanzada. En este reporte se presenta la detección de un mosaico de trisomía 21 en líquido amniótico, mediante la técnica de Banda G donde se analizaron 20 metafases. Los resultados obtenidos documentan una composición cromosómica 47, XY+21 y 46, XY con una relación 9:11 respecto a las metafases analizadas, confirmándose así el diagnóstico del Síndrome de Down secundario a mosaico.

El siguiente artículo “*Caracterización geométrica euclidiana y fractal de células falciformes*”, a cargo de los investigadores Javier Rodríguez, Martha Castillo, Ana Lucia Oliveros, Yolanda Soracipa y Signed Prieto, de Insight Research Group SAS y la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, caracterizan la forma de las células falciformes mediante una metodología diseñada en el contexto de la geometría fractal y euclidiana. El presente estudio mostró la posibilidad de hacer caracterizaciones más precisas en las células falciformes, a partir de los espacios de ocupación de estas, al superponer la rejilla Kp y determinar las proporciones, contribuyendo de esta manera en el diseño de metodologías que mejoran el reconocimiento de este tipo de células.

El quinto artículo, “*Actividad in vitro de los extractos etanólicos de Lantana camara L., Petiveria alliacea L. y Lippia dulcis T. frente a bacterias patógenas.*”, de los investigadores Nahir Alejandra Navarrete Barragán, Erika Fadime Pita-Ospina, Ruth Mélida Sánchez Mora, Sara Emilia Giraldo Quintero y María Consuelo Bernal Lizarazú, de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia y la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, quienes determinan la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de *Lantana camara L.*, *Petiveria alliacea L.* y *Lippia dulcis T.* sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6380 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Su estudio concluye que, productos naturales derivados de plantas medicinales como los extractos etanólicos de *Lantana camara* y *Lippia dulcis*, presentan actividad antibacteriana sobre *S. aureus* y *P. vulgaris* y podrían ser alternativa promisorio para tratamiento de infecciones bacterianas.



Las investigadoras; Lucía Constanza Corrales Ramírez y Liliana Caycedo Lozano, de la Universidad Colegio mayor de Cundinamarca, contribuyen en su artículo titulado “*Principios físico – químicos de los colorantes utilizados en microbiología*”, analizan las principales coloraciones utilizadas en microbiología y explican los fundamentos físicos y químicos de dichos procesos. Su revisión concluye que la utilización de los colorantes en los procesos de identificación en microbiología se fundamentan en las propiedades fisicoquímicas de estas sustancias. Así mismo, en el campo de la física, la óptica explican cómo todos los objetos son observables dependiendo de las longitudes de onda que se absorben y se transmiten dentro del denominado “espectro visible”.

En el séptimo artículo, titulado “*Características bacteriológicas, físicas y pH del agua de consumo humano del municipio de Une-Cundinamarca.*”, los investigadores Sandra Mónica Estupiñán-Torres, Sara Lilia Ávila de Navia, Diego Barrera Aguirre, Robinson Baquero Torres, Delith Alexandra Díaz Ibañez y Anthony Hever Rodríguez Ramírez, de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, determinaron las características bacteriológicas, físicas y pH del agua para consumo humano que abastece al municipio de Une, Cundinamarca-Colombia. Los investigadores observaron la presencia de Coliformes totales, *E. coli* y *Enterococcus* en las muestras analizadas, en cantidad que sobrepasa lo establecido en la normativa colombiana.

Finalmente, el octavo artículo, y con el que cierra esta edición de la Revista Nova, las investigadoras Sandra Mónica Estupiñán-Torres, Anyi Jiobana Cepeda Ruge, Adriana Marcela Hurtado Díaz y Karen Dayana Vega Pinzón, de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, titulado: “*Calidad bacteriológica del agua del humedal Gualí-Tres Esquinas, Funza, Cundinamarca*”, realizan el diagnóstico de la calidad bacteriológica del agua del Humedal Gualí-Tres Esquinas, por medio de indicadores de aguas residuales (coliformes totales, *Escherichia coli* y *Enterococcus spp*). Este estudio contribuyó a mejorar las condiciones de salud pública de la comunidad analizada.

**Olga Lucía Ostos**  
 Editora Revista NOVA

# Identificación de acciones de salud en el Programa de Control de Sífilis en gestantes, Cartagena de Indias, 2016

Identification of Health Actions in the Syphilis Control Program in Pregnant Women, Cartagena de Indias, 2016

Elvisa Cárdenas Dávila <sup>1</sup>, Elías Alberto Bedoya Marrugo <sup>2</sup>, Yuri Arnold Domínguez <sup>3</sup>, Elin Manrique-Julio <sup>4</sup>

## Resumen

**Fundamento.** La Sífilis Congénita es una infección causada por la diseminación hematológica del *Treponema pallidum* de la gestante infectada al feto. Se conoce que la transmisión materna puede ocurrir en cualquier momento del embarazo, por lo que el control de la enfermedad en la gestante es vital en la atención prenatal. **Objetivo.** Identificar el cumplimiento de acciones de salud comprendidas en el Programa de Control de Sífilis en gestantes de la ciudad de Cartagena de Indias, primer semestre del 2016. **Materiales y métodos.** Estudio observacional descriptivo transversal. Se evaluaron 781 gestantes inscritas en control prenatal de la ciudad, a través de las instituciones prestadoras de servicios de salud (IPS) y empresas promotoras de salud (EPS). **Resultados.** Concluyeron la gestación 358 (45.8%) de las gestantes estudiadas. 25 (6.5%) del total, no se realizaron la VDRL intraparto. Durante el primer trimestre del embarazo, el 99.6% de las evaluadas resultaron VDRL no reactivas (NR). Mientras que en el segundo trimestre fueron evaluadas, el 67.5% y el 57.4%, respectivamente; resultando VDRL reactiva (R) una (0.1%) durante ambos semestres. Del segundo al tercer trimestre de la gestación no se incrementó el número de gestantes no evaluadas (98; 12.5%) y (63; 8, 1%), sin embargo, sí se incrementó (55; 19.8%) (269; 34.4%), respectivamente, el número de las gestantes que están a la espera del tiempo para realizar la prueba. No existió co-infección Sífilis/VIH/SIDA. **Conclusiones.** El control de la sífilis durante la atención prenatal fue deficiente dado por la alta tasa de no adherencia

1. Enfermera, Especialista en Salud Ocupacional, magister en Seguridad y Salud en el trabajo.  
Correo electrónico: benitacardenas2011@hotmail.com  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8087-3669>

2. Administrador Servicios de Salud, Especialista en Salud ocupacional, Especialista en gestión de calidad y auditoría en Salud, Magister en Administración. Fundación Universitaria Tecnológico Comfenalco, Grupo CIPEC.  
Correo electrónico: eabedoya8@gmail.com  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2931-9600>

3. Doctor en Medicina. Especialista de I y II grado en Higiene y Epidemiología. Universidad de Ciencias Médicas de La Habana.  
Investigador agregado del Instituto Nacional de Endocrinología, Cuba.  
Correo electrónico: yuri.arnold@infomed.sld.cu  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4901-8386>

4. Médica. Especialista en Salud Ocupacional, Magister en Toxicología. Universidad de Cartagena. Fundación BIOVIDA  
Correo electrónico: emanriquej@unicartagena.edu.co  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3092-9286>



al cumplimiento de asistencia a la consulta por la gestante, como la no realización de la prueba acorde al tiempo establecido por parte del equipo de salud.

**Palabras claves:** Embarazo; epidemiología; sífilis (fuente: DeCS BIREME).

### Abstract

**Basis.** Congenital Syphilis is an infection caused by the hematogenous spread of *Treponema pallidum* from the pregnant woman infected to the fetus. At the time of pregnancy, control of the disease during pregnancy is vital in prenatal care. **Objective.** To identify the fulfillment of the health actions included in the Syphilis Control Program in pregnant women of the city of Cartagena de Indias, first half of 2016. **Materials and methods.** Cross-sectional descriptive observational study. A total of 781 prenatal control pregnant women were evaluated in the city, through the institutions that provide health services (PHI) and health promotion companies (PHE). **Results.** Gestation was completed in 358 (45.8%) of the pregnant women studied. In 25 (6.5%) of the total, intrapartum VDRL was not performed. During the first trimester of pregnancy 99.6% of the resulting non-reactive VDRL (NR) evaluations. While in the second trimester, they were evaluated, 67.5% and 57.4%, respectively; resulting reactive VDRL (R) one (0.1%) during both semesters trimesters. From the second to the third trimester of pregnancy, the number of pregnant women was not increased (98, 12.5%) and (63, 8, 1%), however, if it increased (55, 19.8%) (269; 34.4 %), respectively, pregnant women who are waiting for the time to perform the test. There is no co-infection Syphilis/HIV/ AIDS. **Conclusions.** The control of syphilis during prenatal care was deficient given the high rate of non-adherence in the compliance of the treatment in the pregnant woman, as their tests were not made according to the time established by the health team.

**Keywords:** Pregnancy; Epidemiology; Syphilis (source: DeCS BIREME).

### Introducción

La sífilis es una enfermedad sistémica y crónica, causada por la espiroqueta *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*, transmitida principalmente por contacto sexual. Esta enfermedad es especialmente preocupante durante el embarazo debido al riesgo de in-

fección transplacentaria en el feto [1]. Cada año se reportan de manera continua muertes fetales y mortalidad infantil temprana por sífilis [1, 2]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que cada año ocurren hasta 1,5 millones de casos de sífi-

lis gestacional (SG) [3]; por lo cual, esta se considera un grave problema de salud pública. Debe mencionarse que América Latina y el Caribe (ALC) tiene una tasa de sífilis materna más alta que cualquier otra región, estimada por la OMS entre 1997 y 2003 en 3,9%. Con dicha tasa se calcula que puede haber aproximadamente 459.108 casos de SG en la región de las Américas (exceptuando EE. UU. y Canadá), originando cada año de 164.222 a 344.331 casos de sífilis congénita [4, 5]

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha propuesto la meta de eliminar la sífilis congénita como problema de salud pública llevando la incidencia a 0,5 casos o menos, incluidos los mortinatos, por 1.000 nacidos. Para lograr esta meta, es necesario que se detecten y traten más de 95% de las gestantes infectadas, con lo que se logrará reducir la prevalencia de sífilis durante la gestación a menos de 1,0% [5].

En Colombia, con los programas de vigilancia y control gestacional, la notificación de casos de SG y sífilis congénita (SC) han ido en aumento desde 1996. Sin embargo, aún existe subregistro en gran parte del territorio nacional. No obstante, se calculó que la proporción de incidencia de la SC ha pasado de 0,90 casos por 1000 nacidos vivos en 1998 a 2,43 casos en 2013 y la razón de prevalencia para SG de 1.3 casos por 1000 nacidos vivos en 2003 a 6,60 en 2013 [4,6]

La sífilis se puede dividir en varias etapas: sífilis primaria, secundaria, latente y terciaria.

Las manifestaciones clínicas de la sífilis no están aparentemente alteradas por el embarazo y la transmisión vertical puede ocurrir en cualquier momento y etapa de la sífilis [7]. El riesgo de transmisión de la enfermedad se correlaciona con la extensión de la presencia de espiroquetas en la circulación sanguínea, por lo que la sífilis primaria y secundaria conllevan un mayor riesgo de transmisión que la sífilis latente y terciaria [8].

La SC es la complicación más devastadora de la SG y es causa de desenlaces adversos del embarazo como abortos, muertes fetales o neonatales (40-81%), recién nacidos con bajo peso al nacer o con un cuadro clínico de SC (15-32%) [5,8]

Las investigaciones señalan que los principales factores que determinan la infección fetal y sus resultados adversos son el estadio de la SG, así como el tiempo de exposición en el útero y por ello se considera prioritario detectar la infección materna precozmente de manera que se pueda realizar oportunamente el manejo que garantice la curación materna, prevenga la reinfección y elimine la infección congénita [5,6] La SG se diagnostica de manera similar a la población no embarazada. La OMS recomienda la realización de pruebas treponémicas y no treponémicas (FTA-ABS, RPR, VDRL ) para lograr establecer el diagnóstico de esta entidad[8, 9].

La detección sistemática y el tratamiento de las mujeres gestantes con sífilis se recono-



ce como una intervención barata y factible para prevenir la sífilis gestacional, pero a pesar y de su naturaleza prevenible, la sífilis congénita sigue siendo común en muchas partes del mundo. Se cree que la mayoría de los casos de transmisión de sífilis durante el embarazo ocurren en el útero de forma transplacentaria, aunque es posible la transmisión durante el parto [12]. La infección en periodo de lactancia es poco frecuente, aunque se da en casos donde existen lesiones infecciosas en la mama [13].

Sin duda, la prueba prenatal de laboratorio para la sífilis juega un papel importante en el diagnóstico, y una diferencia significativa en el riesgo de tener un resultado adverso ya que la detección temprana permitirá un tratamiento temprano para la madre, lo cual reduce el riesgo SC [14]. Tras el diagnóstico de sífilis, las mujeres embarazadas deben realizarse un examen clínico y serológico mensual hasta el parto y, posteriormente, realizar un seguimiento como en pacientes no embarazadas y el tratamiento a la pareja sexual también es un aspecto importante para el manejo y la prevención de la enfermedad [15].

Las estrategias de salud pública para prevenir la SG y SG son similares a las que se enfocan en la sífilis y otras enfermedades de transmisión sexual en la población general, pero la detección prenatal de rutina es la principal línea de defensa contra la SC. El factor principal que explica la incapacidad para prevenir una infección congénita es la falta de atención prenatal. La probabilidad

de buscar atención prenatal está fuertemente asociada con la edad, estado civil y socioeconómico, residencia rural y educación [16]. Se han determinado porcentaje de gestantes con sífilis en edades comprendidas entre 15 y 19 años, con especial énfasis en pacientes de raza negra, cuyo estado civil es casadas y con bajo nivel educativo, este último factor dificulta el acceso a los tratamientos para la enfermedad [17]. Para reducir la prevalencia de la SG y la SC es esencial que los profesionales de la salud y la comunidad tomen conciencia de la importancia del diagnóstico precoz y el tratamiento eficaz de las mujeres y sus parejas [18]. La eliminación de la SC como problema de salud pública solo será posible si se emprenden también intervenciones en los grupos vulnerables, como homosexuales, trabajadoras sexuales, consumidores de drogas y poblaciones móviles (migrantes, transhumantes, transportistas) [19]. Se requiere un esfuerzo para aumentar la conciencia sobre la extensión y la gravedad de la sífilis en el embarazo en todos los niveles de los servicios de salud, respaldados por un compromiso de política de estado.

## Metodología

Se desarrolló un estudio descriptivo, que abarcó 781 gestantes evaluadas como asistentes a consulta externa en una IPS en la ciudad de Cartagena, durante el primer semestre de 2016. Se estudiaron clínicamente pacientes gestantes entre los 14 y 45 años de edad, consignando sus datos en la histo-

ria clínica (datos sociodemográficos, afiliación al sistema, antecedentes personales y familiares). Se analizaron muestras de suero sanguíneo de las madres, donde se diagnosticaron mediante pruebas tamiz no treponémicas como la prueba de selección para sífilis Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) aplicadas durante el primer, segundo y tercer trimestre del embarazo y prueba de VIH, sumado a la evaluación clínica, practicada a la madre gestante que permitieron la confirmación diagnóstica en relación a la sífilis. A partir de las evaluaciones realizadas, se recolectaron datos los cuales fueron tabulados y procesados mediante el diligenciamiento de cuadros en el programa excel, para proseguir con el manejo de las

tablas y gráficos obtenidos principalmente en cifras porcentajes relacionadas.

## Resultados

Se evaluaron 781 mujeres gestantes, con promedio de edad de 26 años (DS 6.03), donde la menor edad registrada fue 14 años y la máxima de 47 respectivamente; nivel socioeconómico, donde 623 (80%) pertenecen al estrato 1; se hallaron 145 (19%) pertenecientes al estrato 2 y 13 (1%) al estrato 3; mientras que el 41% de las evaluadas son madres solteras y 51% viven en unión libre, 8% se han casado y un 1% son viudas (ver Tabla 1).

**Tabla 1.** Distribución sociodemográfica de las evaluadas.

Total Evaluadas	781	
Estrato 1.	623	80%
Estrato 2.	145	19%
Estrato 3.	13	2%
Madre solteras	321	41%
Casadas	59	8%
Unión libre	396	51%
Viuda	5	1%
Primaria	365	47%
Secundaria	359	46%
técnico	44	6%
Profesional	6	1%
Otro	7	1%

**Fuente.** Evaluación a gestantes del proyecto.

Del total, 365 (47%) afirma haber estudiado hasta el nivel primario y otros 359 (46%) hasta algún grado de secundaria; 44(6%) son técnicos en alguna disciplina mientras el (1%) corresponde a profesionales y otro nivel educativo no especificado.

Se realizó un análisis del número de gestantes estudiadas que presentaron serología positiva y a la vez obtenida la causa se procede a revisar dicho comportamiento, tomando las características de las evaluadas de manera inicial, donde entre 781 evaluadas 715

(91,5%) se encontraban activas en alguna empresa promotora de servicios de salud y 66 (8.5%) habían sido canceladas de algún ente de previsión. De los 715 activas en em-

presa promotora de servicios de salud 713 (91.3%) pertenecen al régimen contributivo, mientras que 2 (0.3%) son del régimen subsidiado (ver Tabla 2).

**Tabla 2.** Características de gestantes evaluadas según régimen de afiliación.

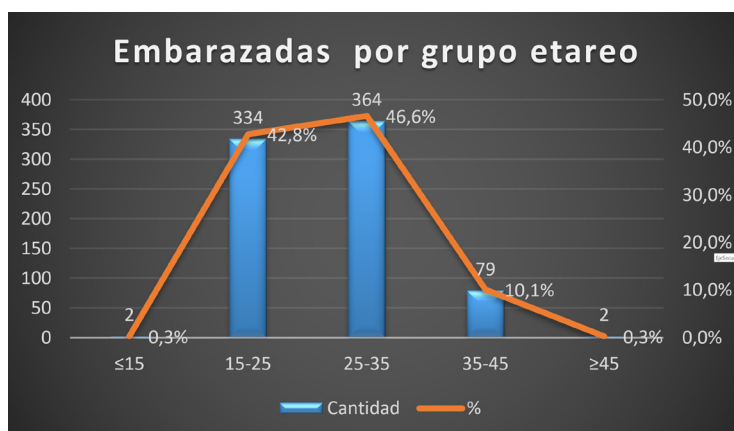
Gestantes en cuenta de alto costo periodo 01/08/2015 _ 31/05/2016	Cantidad	
<i>Total gestantes inscritas en control prenatal en periodo</i>	<b>781</b>	%
Gestantes activas en asegurador	715	91,5
Gestantes canceladas en asegurador	66	8,5
Gestantes inscritas en control prenatal en contributivo	713	91,3
Gestantes inscritas en control prenatal en subsidiado	2	0,3

**Fuente.** Encuestas epidemiológicas de la entidad promotora de salud.

Entre el grupo global de embarazadas objeto del estudio se ha determinado que 364 (46.6%) pertenecen al grupo de edades comprendida entre los 25 y 35 años; mientras 334 de las evaluadas (42.8%) están comprendidas entre los 15 y 25 años;

un grupo de 79 embarazadas (10.1%) se incluye en el grupo de 35 a 45 años; solo se encontraron 2 gestantes en los intervalos de las menores de 15 años y mayores de 45 años respectivamente (ver Gráfico 1).

**Gráfico 1.** Distribución de embarazadas organizadas por grupo etareo.

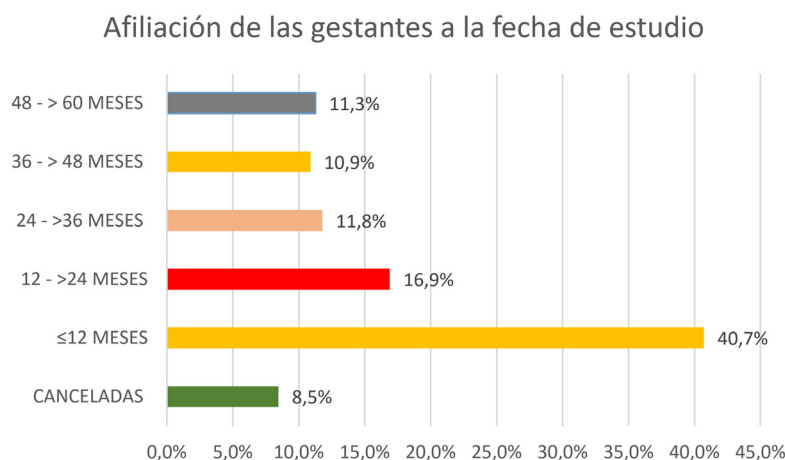


**Fuente.** Investigadores.

De la muestra obtenida con 781 participantes, 66 de estas (8.5%) se hallaron canceladas de los regímenes contributivo y subsidiado. Las 66 gestantes correspondientes al 8.5% que se registraban como canceladas de algún ente de previsión reciben igual atención por parte de las autoridades de salud distrital por parte del departamento ad-

ministrativo distrital de salud (DADIS), lo cual evitará que estas queden excluidas del modelo de atención prenatal y parto, lo cual garantizará la atención prioritaria al estar embarazadas, incluidas en el programa especial de atención prenatal y cobertura por el Sistema de identificación de beneficiarias (SISBEN) a nivel nacional (Ver Gráfico 2).

**Gráfico 2.** Afiliación al Sistema de salud.



**Fuente.** Investigadores.

El promedio de meses de afiliación es de 45 (DS 31.5). Un grupo de 318 gestantes (40.7%) presentaron afiliación a empresa promotora de servicios de salud durante un año o menos; mientras 132 (16.9%) han estado afiliadas durante más de un año y menos de dos; 92 gestantes (11.8%) están afiliadas entre 2 y tres años; 88 gestantes (11.3%) se hallaron afiliadas durante más de 4 años y menos de 5. Sólo el porcentaje (10.9%) agrupó a mujeres gestantes afiliadas entre tres y cuatro años (ver Gráfico 2). Lo anterior demuestra que la atención al servicio de salud bajo las diferentes mo-

dalidades está cubierta, los impedimentos para acceder a las acciones de prevención y promoción para las gestantes se relacionan con el factor cultural, desinformación o no acudir a las instalaciones hospitalarias de primer y segundo nivel de atención, debido a que todas las gestantes evaluadas viven en el casco urbano de la ciudad de Cartagena. 383 gestantes llegaron al final del embarazo durante la investigación, 358 de estas (93.5%), se evaluaron con VDRL intraparto y solo 25 de estas (6.5%) no se realizó la mencionada prueba. Ninguna de las evaluadas en esta prueba resultó reactiva para



sífilis. En cuanto a la evaluación por VDRL I, en el primer trimestre 99.6% de las evaluadas resultaron no reactivas para sífilis y solo tres del total no se realizó la mencionada prueba. En el segundo trimestre, 527 (27.5%) fueron evaluadas, resultando reactiva para sífilis una gestante, un preocupante 12.5% no acudió a la evaluación y 19.8% está a la espera del tiempo (cumplir el se-

gundo trimestre del embarazo) para realizar la prueba. También fueron evaluados con VDRL III 57.4%, manteniéndose una gestante reactiva para sífilis y un 8.1% no acudió a realizarse el control respectivo, mientras otro 34% espera la fecha para realizar el procedimiento de control por VDRL III. De las 781 gestantes evaluadas ninguna dio positivo para VIH (ver Tabla 3).

**Tabla 3.** Resultados de pruebas para sífilis y VIH.

EVALUADOS POR VDRL INTRAPARTO	Cantidad	%
CON VDRL INTRAPARTO	358	93,5%
SIN VDRL INTRAPARTO	25	6,5%
REACTIVO PARA SIFILIS	0	0,0%
NO REACTIVO PARA SIFILIS	383	100,0%
TOTAL	383	100,0%
EVALUADOS POR VDRL	Cantidad	%
CON VDRL I	778	99,6%
REACTIVO PARA SIFILIS	0	0,0%
NO SE REALIZARON PRUEBAS	3	0,4%
A LA ESPERA DE PRUEBAS	0	0,0%
CON VDRL II	527	67,5%
REACTIVO PARA SIFILIS	1	0,1%
NO SE REALIZARON PRUEBAS	98	12,5%
A LA ESPERA DE PRUEBAS	155	19,8%
CON VDRL III	448	57,4%
REACTIVO PARA SIFILIS	1	0,1%
NO SE REALIZARON PRUEBAS	63	8,1%
A LA ESPERA DE PRUEBAS	269	34,4%
EVALUADOS POR VIH	Cantidad	%
CON ELISA PARA VIH	775	99,2%
NO SE REALIZARON PRUEBAS	6	0,8%
POSITIVO PARA VIH	0	0,0%
TOTAL	781	100,0%

**Fuente.** Investigadores.

## Discusión

Los resultados que se pueden visualizar en la tabla de distribución sociodemográfica indican que las personas objeto de estudio tienen la posibilidad de acceder con facilidad a la atención e información sobre la enfermedad, lo que configura una necesidad de ampliar los conceptos sobre cómo desarrollar una cobertura adecuada en salud que fundamente un mayor conocimiento sobre la enfermedad y su prevención; que a pesar de ser Colombia un país en vía de desarrollo puede decirse que está logrando un indicador favorable para evitar la propagación de infecciones y enfermedades de transmisión sexual, como la sífilis, contrariamente a lo indicado por el estudio de la OPS, en el cual se señala que los países no industrializados han de padecer de altos niveles de enfermedades transmisibles por su condición de subdesarrollo. También coincide con el estudio adelantado por Herrera y Rodríguez [17], quienes consideran que el bajo nivel educativo afecta decididamente a las mujeres frente al padecimiento de la sífilis, mientras se observa en los resultados de este estudio que todas las evaluadas ostentaban algún nivel educativo, lo cual les permite el acceso a la información de diferentes fuentes y además cuentan con edad promedio de 26 años y conforme estudios como el planteado por la anterior autora; es común encontrar pacientes en estos rangos de edad.

En este estudio no se abordó el aspecto racial para comprobar mayor afectación en-

tendiendo que Colombia es un país multi-racial y no hace distinciones de color ni raza en sus servicios de salud, aunque en textos académicos aún se indica dicha característica como factor de riesgos a tener en cuenta.

En cuanto a la cobertura de los servicios de salud, esta es una fortaleza del sistema de salud colombiano, detectada en la anterior investigación debido a que la totalidad de las evaluadas tenían algún nivel de previsión social en salud, tanto en el régimen subsidiado como en el contributivo y a falta de estos dos, una tercera figura de aseguramiento, lo que conforme a la OMS permitirá la realización de las pruebas serológicas necesarias para lograr un diagnóstico que garantice el adecuado tratamiento de la enfermedad.

De acuerdo con la OMS, se estima que cada año ocurren hasta 1,5 millones de casos de sífilis gestacional. En el presente estudio solo se detectó un caso positivo de sífilis entre los 781 casos evaluados. Sin embargo, no deja de preocupar la deserción de gestantes en el proceso de control del embarazo, lo cual es un factor igualmente peligroso si de eventos recurrentes se trata, donde al generarse SG y por ende se producirá SC que al no ser diagnosticada ni tratada puede producir todas las complicaciones de salud ya mencionadas e incluso la muerte fetal, por lo cual no deja de ser un problema de salud pública bastante considerable.

En este estudio no se abordó la temática de afinidades sexuales; sin embargo, las evalua-

das tuvieron a bien manifestar su heterogeneidad sexual, aunque no deja de ser una característica importante a resaltar como el acercamiento que estas puedan tener con grupos de comunidad homosexual, consumidores de drogas y las poblaciones móviles (migrantes, transhumantes, transportistas) mencionados ampliamente en varias investigaciones [19-21], sobre sífilis materna y sífilis congénita.

## Conclusión

Las mujeres gestantes infectadas por sífilis pueden transmitir la infección al feto, provocándole sífilis congénita, que conlleva efectos adversos graves para el embarazo en hasta el 80% de los casos. Por ello, la asistencia al control prenatal es importante, y es pilar fundamental en la detección eficaz de alteraciones en el embarazo. Debido a que, de no tratar adecuadamente la sífilis, la embarazada puede sufrir afecciones serias en su gestación tales como aborto espontáneo, muerte fetal, nacimiento prematuro y Sífilis Congénita. Debido a la conexión existente entre la sífilis congénita y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) las pacientes halladas positivas para sífilis también son susceptibles para la prueba de VIH. La detección temprana de ambas afecciones se obtiene con un análisis de sangre; si resulta reactivo para sífilis, un sencillo tratamiento a base de penicilina permite curar tanto a la mamá como al bebé. Cabe resaltar que la sífilis congénita es una enfermedad evitable con tratamiento específico, eficaz y precoz,

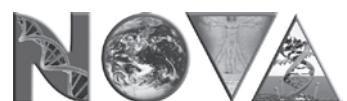
además es de bajo costo y se encuentra disponible en todos los servicios de salud del primer nivel de atención. Prevenir la transmisión materno-infantil de la sífilis cuesta un poco más de un dólar, la mayor peligrosidad en este caso es la no asistencia al servicio de salud para informarse a tiempo evitando el contagio y las complicaciones que este trae para la madre y el bebé.

## Referencias

1. A. A. Wahab, U. K. Ali, and M. Mohammad, "Syphilis in pregnancy," *Pakistan J. Med. Sci.*, vol. 31, no. 1, pp. 2014–2016, 2014.
2. M. Magalhães, L. Basto, A. Luísa, M. Eulália, and A. Paulo, "Syphilis in Pregnancy and Congenital Syphilis : Reality in a Portuguese Central University Hospital," *Rev. Bras. Gineoobstetricia*, vol. 39, no. 6, 2017.
3. World Health Organization, *Infecciones de Transmisión Sexual 2016–2021*. Geneva, Switzerland., 2016, pp. 5–64.
4. I. N. de Salud, *Protocolo de Vigilancia en Salud Pública: Sífilis gestacional y Sífilis congénita*. Colombia, 2015, pp. 2–40.
5. OPS, *Guía clínica para la eliminación de la transmisión materno infantil del VIH y de la sífilis congénita en América Latina y el Caribe*. USA, Washington D.C., 2009, pp. 1–100.
6. M. de S. de Colombia, *Guía de práctica clínica ( GPC ) basada en la evidencia para la atención integral de la sífilis gestacional y congénita*. Colombia, 2014, pp. 3–25.
7. M. De Santis et al., "Syphilis Infection during Pregnancy : Fetal Risks and Clinical Management," *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, vol. 2012, pp. 3–5, 2012.

8. J. E. Stoltey, S. E. Cohen, S. Francisco, and S. Francisco, "Syphilis transmission : a review of the current evidence," *Sex Heal.*, vol. 12, no. 2, pp. 103–109, 2018.
9. R. E. Plotzker, R. D. Murphy, and J. E. Stoltey, "Congenital Syphilis Prevention : Strategies , Evidence , and Future Directions," *Sex. Transm. Dis.*, vol. 45, no. 9, pp. 29–37, 2018.
10. M. de S. de Colombia, *Plan de Intensificación para la Eliminación de la Sífilis Congénita*. Colombia, 2016, pp. 6–10.
11. R. Creasy, Robert K. Resnik, *Creasy and Resnik's Maternal-Fetal Medicine*, 7th ed. Philadelphia, 2014.
12. J. S. Slutsker, R. R. Hennessy, and J. A. Schillinger, "Factors Contributing to Congenital Syphilis Cases — New York City , 2010 – 2016," *MMWR Morb Mortal Wkly Report.*, vol. 67, no. 39, pp. 1088–1093, 2018.
13. W. J. Ledger, "Syphilis in pregnancy Review," *Br. Med. J.*, vol. 76, no. 2, pp. 73–79, 2000.
14. S. J. Hawkes, G. B. Gomez, and N. Broutet, "Early Antenatal Care : Does It Make a Difference to Outcomes of Pregnancy Associated with Syphilis ? A Systematic Review and Meta-Analysis," *PLoS One*, vol. 8, no. 2, 2013.
15. W. H. Organization, *Syphilis screening and treatment for pregnant women*. Geneva, Switzerland, 2017.
16. M. L. Kamb et al., "A Road Map for the Global Elimination of Congenital Syphilis," *Obs. Gynecol Int.*, vol. 2010, pp. 1–6, 2010.
17. L. . Herrera,Vivian. Rodríguez, "Incidencia de la sífilis durante el embarazo," *Rev. Cuba. Med. Gen. Integr.*, vol. 13, no. 4, pp. 352–358, 1997.
18. C. Padovani, R. R. De Oliveira, and S. M. Pelloso, "Syphilis in during pregnancy : association of maternal and perinatal characteristics in a region of southern Brazil 1," 2018.
19. Pereira Palacio, J., Gaviria Mejía, L., Zea-Castrillón, S., Jaramillo Arbleáez, P., & Bedoya, A. (2018). Descripción de pruebas moleculares en el diagnóstico del virus Zika en el periodo 2008-Febrero 2018. Revisión sistemática. NOVA, 16(30), 81-93. <https://doi.org/10.22490/24629448.2838>
20. Pinilla B., G., Chavarro, B., Moreno, N., Navarrete, J., & Muñoz, L. (2015). Determinación de los genes, 16S ADNr, polA, y TpN47, en la detección de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita. NOVA, 13(24), 17-26. <https://doi.org/10.22490/24629448.1713>
21. F. ValderramaI,Julia. Zacarías, "Maternal syphilis and congenital syphilis in Latin America: big problem, simple solution," *Rev. Panam. salud publica*, vol. 16, no. 4, pp. 211–217, 2004.





**NOVA Publicación Científica  
en Ciencias Biomédicas**

# Perspectivas en investigación: células HEp-2 infectadas con EB's de *Chlamydia trachomatis* serovar 2 (VR-902B)

HEp-2 Cells Infected with EB's from *Chlamydia trachomatis* serovar 2 (VR-902B): Research Perspectives

Natalia Castellanos Hernández <sup>1</sup>, Yessica Marcela Castañeda Franco <sup>2</sup>, Paola Andrea Caro Burgos <sup>3</sup>, Ruth Mélida Sánchez Mora <sup>4</sup>

## Resumen

*Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) es una bacteria Gram negativa inmóvil, caracterizada por ser un microorganismo intracelular obligado y por poseer un ciclo reproductivo en el que puede distinguirse una forma infecciosa extracelular metabólicamente inerte (cuerpo elemental - EB's), y una forma no infecciosa intracelular y activa (cuerpo reticulado - RB's). *C. trachomatis* se caracteriza por causar infección en humanos, está relacionada con enfermedades de transmisión sexual e infecciones oculares; por lo que puede conllevar a secuelas de interés, si no se da un tratamiento oportuno. El objetivo de este estudio fue optimizar el modelo de infección de *C. trachomatis* en células HEp-2 con cuerpos elementales (EB's) de *C. trachomatis* serovar L2. Inicialmente, se establecieron las condiciones para el crecimiento adecuado de las células HEp-2 en tiempo y con una confluencia del 90%, para continuar con la optimización de un protocolo de infección. La infección fue confirmada a partir de la coloración con Giemsa permitiendo evaluar características morfológicas tanto de las células HEp-2 sin infectar e infectadas, y así mismo, de los cuerpos elementales de *C. trachomatis*. Finalmente, se corroboró la infección con la técnica de inmunofluorescencia directa que detecta la proteína de membrana MOMP de *C. trachomatis*. Tras los ensayos realizados se evidenció la presencia de cuerpos elementales próximos y dentro del citoplasma celular, así como células vacuoladas y daño celular causado por la infección.

**Palabras claves:** *C. trachomatis*, cultivo celular, asintomático, infección, persistencia, Giemsa, inmunofluorescencia, HEp-2, LGV.

1. Dirección de Sanidad, Ejército Nacional de Colombia - Batallón BIAMA - Quibdó, Chocó. Bacterióloga SSO.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5542-8739>

2. Dirección de Sanidad, Ejército Nacional de Colombia - Batallón ASPC N° 9 - Neiva, Huila. Bacterióloga SSO.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2248-3934>

3. Dirección de Sanidad, Ejército Nacional de Colombia - Batallón ASPC N° 12 -Montería, Córdoba. Bacterióloga SSO.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7745-4401>

4. Docente Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Líder del semillero y grupo investigación Biotecnología y Genética, UCMC.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0572-8418>

## Abstract

*Chlamydia trachomatis* (*C. Trachomatis*) is a Gram negative unmoving bacterium, characterized by being an obligate intracellular microorganism and having a reproductive cycle in which a metabolically inactive extracellular infectious form (elementary body - EB's) can be distinguished from an intracellular active and non-infectious form (reticulated body - RB's). *C. trachomatis* is characterized by causing infection in humans, is related to sexually transmitted diseases and eye infections, so it can lead to sequelae of interest if timely treatment is not given. The objective of this study was to optimize the infection model of *C. trachomatis* in HEp-2 cells with elementary bodies (EB's) of *C. trachomatis* serovar L2. Initially, the conditions for the adequate growth of HEp-2 cells were established in time and with a confluence of 90%, to continue with the optimization of an infection protocol. The infection was confirmed from the staining with Giemsa allowing to evaluate morphological characteristics of both uninfected and infected HEp-2 cells and also of the elementary bodies of *C. trachomatis*. Finally, the infection was corroborated with the direct immunofluorescence technique, that detects the *C. trachomatis* MOMP membrane protein. After the tests were performed, the presence of elementary bodies nearby and within the cellular cytoplasm was evidenced, as well as vacuolated cells and cellular damage caused by the infection.

**Keywords:** *C. trachomatis*, cell culture, asymptomatic, infection, persistence, Giemsa, immunofluorescence, HEp-2, LGV.

## Introducción

En la última década se han desarrollado una variedad de estudios que giran en torno al uso de modelos de investigación, un ejemplo de ello es el uso de las líneas celulares. Los modelos celulares se establecen como una herramienta del conocimiento en relación con el nivel celular del desarrollo del organismo humano, ya que orienta la comprensión de tres características básicas: patrón particular en cuanto a la síntesis de proteínas, cambios morfológicos adaptativos e información genética contenida en las células, para así poder postular un modelo

efectivo encaminado al desarrollo y producción de conocimiento en investigación. La técnica del cultivo celular ha permitido conocer el comportamiento *in vitro* de las células cancerosas y patologías en general, constituyendo una herramienta básica de aplicación fundamental en el campo médico o veterinario, en investigación y en la industria farmacéutica, ya que en las diferentes áreas se pretende analizar, describir, explicar, simular y entender un proceso fisiopatológico (1).

La línea celular HEp-2 (Human Epidermoid carcinoma cepa N° 2), también conocidas como Human Epithelioma, fue descrita por primera vez por Moore, Saba-chewsky y Toolan en 1952 (2). Esta línea celular se ha empleado para evaluar la infección con *C. trachomatis*, lo que permite realizar estudios en el comportamiento de la infección frente a diferentes áreas del conocimiento. Es una línea metabólicamente activa lo que favorece el cultivo de la misma para su posterior infección. *C. trachomatis* es una bacteria Gram negativa, intracelular obligada porque carece de habilidad para sintetizar ATP, se caracteriza por causar infecciones de transmisión sexual en humanos, especialmente en poblaciones que se encuentran en edades sexualmente activas (3). En Colombia, se ha reportado una prevalencia del 6% (4).

Las infecciones causadas por *C. trachomatis* están relacionadas con enfermedades como la artritis de inicio temprano e infecciones oculares como el tracoma. Por otro lado, la infección con este microorganismo es de gran importancia en salud pública, por el curso asintomático de la infección, produciendo graves secuelas en mujeres por falta de tratamiento, entre ellas: infertilidad, cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica (EPI), dolor pélvico crónico y la posibilidad de padecer un embarazo ectópico. La infección por *C. trachomatis* se trata con antibióticos; sin embargo, la resistencia al tratamiento ha aumentado, lo que ocasiona persistencia del microorganismo en algunos pacientes (5).

Los cultivos celulares para infectar células con *C. trachomatis*, en la investigación básica, permite estudiar fenómenos complejos como, por ejemplo, la actividad intracelular, específicamente la transcripción de ADN, síntesis de proteínas, metabolismo energético, ciclo celular, diferenciación, apoptosis, el flujo intracelular de biomoléculas, como el procesamiento del ARN, el movimiento de las proteínas hacia diversos orgánulos; y, en cuanto a genómica y proteómica, el análisis genético, transformación celular, immortalización, senescencia, expresión génica, rutas metabólicas, entre otros (6). Por lo anterior, en este estudio se optimizó la infección de la línea celular HEp-2 con *C. trachomatis* serovar L2 (VR- 902B) como modelo de investigación básica para realizar estudios con este microorganismo, lo que permitirá evaluar diversos factores morfológicos, genéticos, inmunológicos y de tratamiento.

## Metodología

### *Establecimiento del cultivo de la línea celular HEp-2*

Las células HEp-2 fueron obtenidas de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) con una confluencia del 80%. Se mantuvieron en medio Eagle's Modificado Dulbecco's (DMEM), suplementado con suero fetal bovino al 20% (Gibco) y agregando gentamicina, hasta alcanzar una confluencia del 90%. Luego se procedió a congelar las células utilizando tripsi-



na + EDTA al 0,25% y suero fetal bovino al 90%. Durante los protocolos se realizó un conteo de viabilidad celular por medio del método de exclusión de Azul de Tripán. La coloración de Giemsa realizada presentó algunas modificaciones, siendo necesario ajustar los volúmenes para apreciar de manera óptima las células. Cabe aclarar que se mantuvo la relación de colorante de 30 partes de solución amortiguadora y 1 parte de solución madre, y el mismo tiempo de contacto. Todos los protocolos que se utilizaron fueron estandarizados por Jutinico y colaboradores (7).

### *Infección de células HEp-2 con EB's de C. trachomatis serovar L2*

El protocolo de infección optimizado fue tomado de Engstrom y col. (8). Inicialmente, las células HEp-2 fueron sembradas a diferentes concentraciones en láminas portaobjetos MilliCell EZ SLIDE, con el fin de determinar la concentración a la cual se obtiene una confluencia óptima del 90%, determinando que al 5% de CO<sub>2</sub> 5% de SFB a 37°C durante 24 horas se obtenía una confluencia del 90%.

Para determinar la concentración de cuerpos elementales necesarios para la infección, se retiró el medio DMEM del cultivo y se realizaron lavados con el *buffer* solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) durante 1 minuto cada uno; esto con el fin de retirar detritos y células muertas. Una vez lavadas las células los EB's diluidos en *bu-*

*ffer* estéril de Sucrose-Phosphate-Glutamate (SPG se distribuyeron en 6 de los 8 pozos de la lámina, se adiciono una concentración distinta de cuerpos elementales diluidos SPG), partiendo de 10µL, 20µL y 40µL, los 2 pozos restantes fueron empleados como controles negativos de infección. Se les agregó SPG estéril de manera tal que cada pozo se completó a un volumen de 100uL. Posteriormente, se llevó a incubar a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% durante 1 hora y 20 minutos, tiempo tras el cual se agregaron 300uL de medio DMEM suplementado con 20% de SFB a cada uno de los pozos, incluyendo los controles negativos, para un volumen final de 400uL. Esto se llevó nuevamente a incubar a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% y se evaluó a las 24 y 48 horas post-infección (h.p.i). Pasadas las horas post-infección, se eliminó el medio DMEM contenido en cada pozo, se lavaron las células 3 veces empleando HBSS y se fijaron con 2 gotas de metanol al 100% y se tiñeron con Giemsa.

### *Detección de la infección de HEp 2 con EBs de C. trachomatis por inmunofluorescencia directa*

Para corroborar la infección de células HEp-2 con *C. trachomatis* serovar L2 se realizó la técnica de inmunofluorescencia directa, por medio de un anticuerpo primario policlonal de conejo: "Rb pAB to *C. trachomatis* (FITC) ab21211 dirigido contra la proteína de membrana MOMP de *C. trachomatis*". Las células HEp2, una vez infectadas, fueron lavadas con PBS. Posteriormente,

las células se fijaron a las 24 y 48h.p.i con metanol frío (mantenido a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) al 100%. Luego se adicionaron 50uM de cloruro de amonio durante 5 minutos, con el fin de eliminar las trazas de metanol que no fueron removidas. Enseguida se agregó saponina al 0,1% por 10 minutos, para permeabilizar la membrana celular. Luego se procedió a realizar el bloqueo con una solución de PBS al 1% de SFB durante 20 minutos y se preparó una dilución del anticuerpo 1:100 para adicionar en cada pozo. Se mantuvo la lámina durante 1 hora en cámara húmeda a  $37^{\circ}\text{C}$ , se retiró el anticuerpo diluido realizando lavados con PBS y se observó en el microscopio de fluorescencia Leica DM2500. Finalmente, se adicionó colorante Hoechst, para tinción de núcleo y nuevamente se realizaron lavados para visualizar cada pozo al microscopio. Las imágenes se capturaron utilizando Leica DFC425 C, con los filtros I3 y A, con rangos de excitación de  $565 \pm 25$  y  $360 \pm 20$  y luz de color Verde y Azul respectivamente.

### *Evaluación estadística de los datos obtenidos*

La evaluación estadística de los datos obtenidos se realizó a través del software Info-Gram®. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

## **Resultados**

Para realizar la infección de las células HEp2 con EB's de *C. trachomatis*, se partió de cultivos celulares óptimos que permitieran el desarrollo del microorganismo. La línea celular HEp-2 fue cultivada con medio DMEM + SFB (*Gibco*) en una atmósfera de  $37^{\circ}\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ , la infección se demostró con coloración de Giemsa e inmunofluorescencia directa.

### *Estructura y morfología de las células HEp-2 sin infectar*

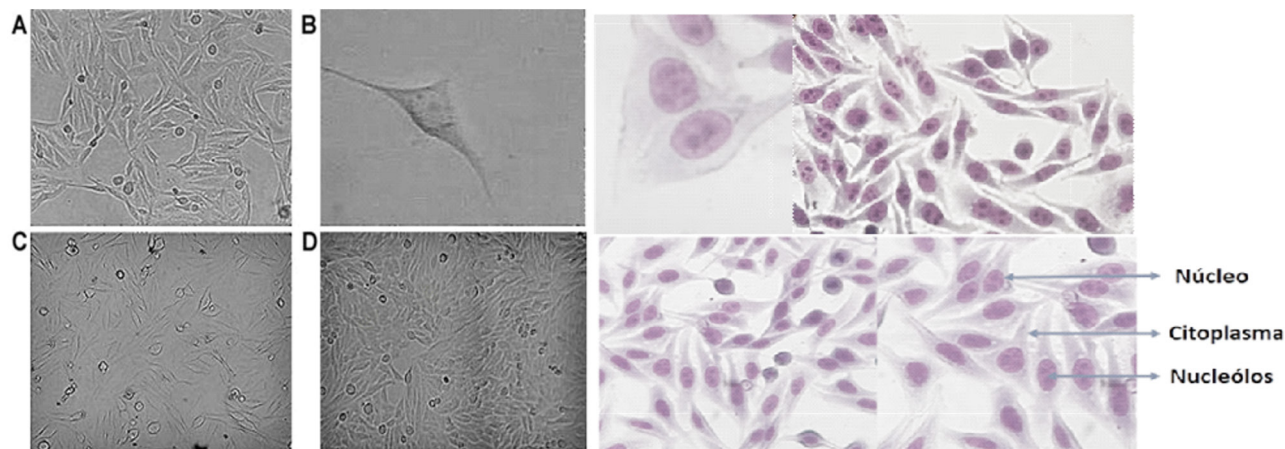
Las células HEp-2 sin infectar fueron visualizadas en un microscopio invertido (*Leica*) en objetivos de 40x y 100x respectivamente, apreciándose células alargadas de forma triangular (ver Figura 1A). Se observó claramente el citoplasma bien definido, núcleo de gran tamaño con 2 nucleolos prominentes (ver Figura 1B). En los cultivos iniciales se evaluó la confluencia en diferentes tiempos, a las 48 horas se obtuvo una confluencia del 70%, donde se distinguieron islotes de células y campos sin adherencia celular (ver Figura 1C). Posteriormente, a las 72 horas, se logró una confluencia óptima del 90% con pocos campos sin adherencia y sin presencia de detritos ni células muertas, criterios importantes para realizar una buena infección (ver Figura 1D).

Las células fueron teñidas con coloración de Giemsa y visualizadas en un microscopio

pio óptico (*Olympus*), observándose células triangulares típicas de HEp-2 en cultivo, con citoplasmas uniformemente teñidos de

morado sin presencia de precipitados, núcleos fucsias bien delimitados y entre 2-3 núcleos oscuros.

**Figura 1.** Estructura y morfología de las Células HEp-2 sin infectar.



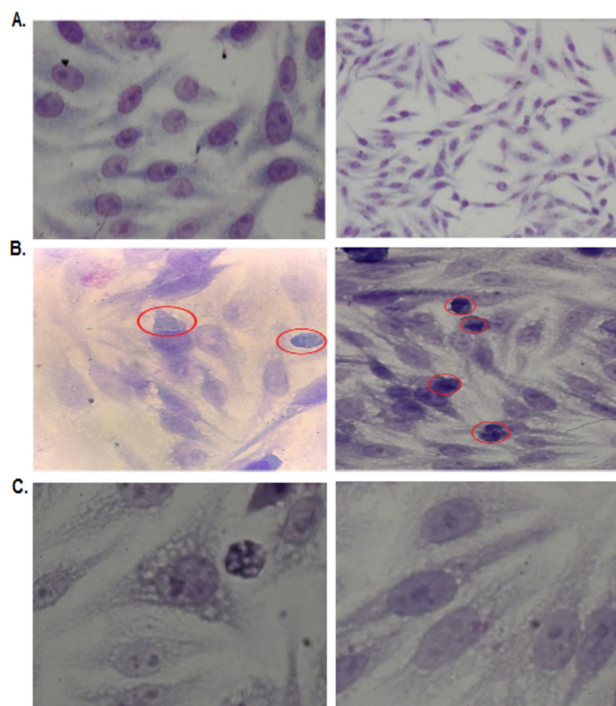
**A.** Se visualizan células HEp-2 observando su estructura (izquierda objetivo 40x). **B.** Se aprecia el citoplasma, núcleo y nucleolos en el microscopio invertido. **C.** Se observa una confluencia del 70% de la línea celular HEp-2, a las 48. **D.** Se observa una confluencia del 90% a las 72 horas. En la derecha se observan las células HEp-2 teñidas con colorante Giemsa y visualizadas al microscopio óptico para diferenciar su estructura, en distintos objetivos.

### *Células HEp-2 infectadas con EB's serovar L2 de C. trachomatis y visualizada con Giemsa*

Las células de cultivo de tejidos en monocapa (HEp-2) se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI) de 1 EB's/célula huésped. Una vez infectadas las células se tiñeron con Giemsa y fueron visualizadas en microscopio óptico. En los pozos control (células HEp-2 sin EB's), se observan células completas, con morfología definida, sin daños en las estructuras, sin precipitados ni formas anexas (ver Figura 2A). En los pozos con células infectadas con *C. tracho-*

*matis* se visualizaron los EB's como formas ovoides con una fuerte coloración morada, intracelulares y próximos a las células (ver Figura 2B). Además, las células presentaron vacuolización y ruptura de las membranas, que sugieren daño celular, (ver Figura 2C).

**Figura 2.** Las células HEp-2 infectadas y teñidas con coloración de Giemsa.



**A.** Se observó la morfología celular de los pozos control, células con citoplasma completo, núcleos y nucleolos definidos, células adheridas en monocapa y sin cuerpos extraños. **B.** Células infectadas con cuerpos elementales de *C. trachomatis* a las 24 h.p.i. Se visualiza una forma de inclusión intracelular señalizadas con circunferencias rojas. **C.** Células vacuoladas post-infección.

### Detección de la infección de HEp-2 con EB's de *C. trachomatis* por Inmunofluorescencia directa

Al ser *C. trachomatis* un parásito intracelular obligado que desarrolla su ciclo de vida dentro del citoplasma, se comprobó la infección por inmunofluorescencia directa utilizando el anticuerpo policlonal *ab 21211* dirigido contra *C. trachomatis*. La evaluación se hizo utilizando el microscopio de fluorescencia *Leica DM2500* y se capturaron las imágenes con el software *Leica DFC425C*. Los pozos con células HEp-2 no infectadas (control) mostraron células con

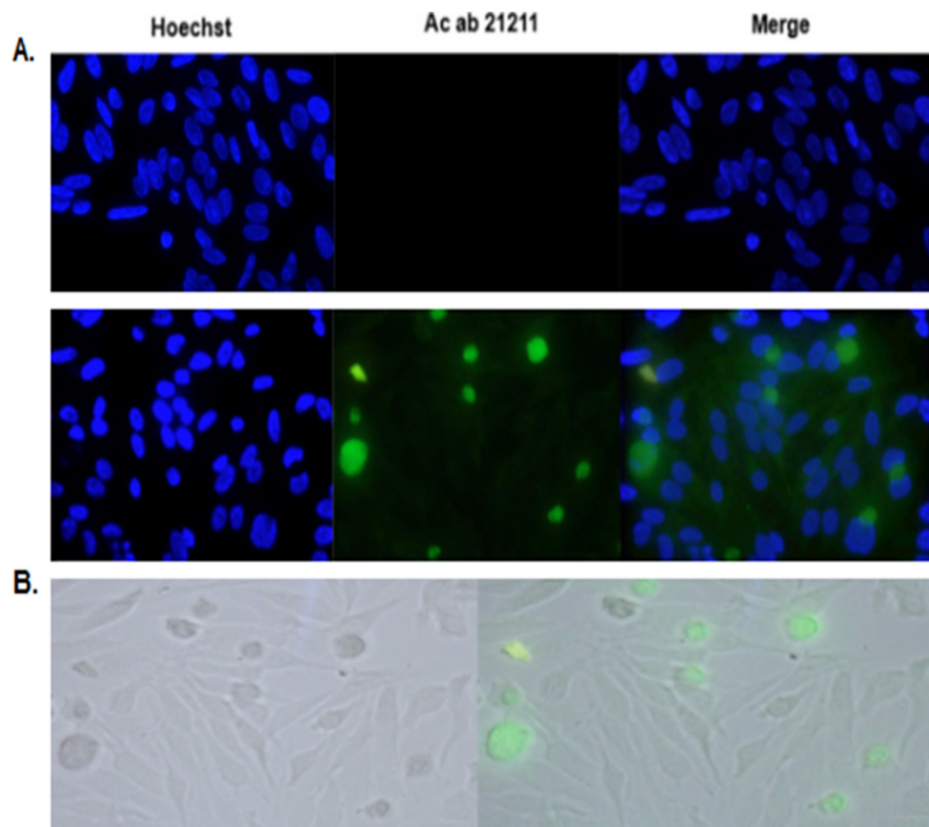
núcleos teñidos uniformemente de azul por el colorante fluorescente Hoechst (filtro A). No se observó la presencia de EB's marcados con el anticuerpo policlonal (filtros I3 verde), confirmando con el *merge* la ausencia del microorganismo (ver Figura 3A). Por otro lado, las células infectadas, mostraron núcleos de tonalidad azul (Hoechst), se observaron estructuras verde fluorescentes de forma ovoide indicando la presencia de *C. trachomatis* (*ab 21211*). Finalmente, en el *merge* se evidenciaron formas próximas a los núcleos celulares correspondientes a EB's de *C. trachomatis* serovar L2, confirmando la infección (ver Figura 3B).



La infección intracelular de *C. trachomatis* en células HEp-2 se confirmó por la captura de la imagen sin filtros, con luz blanca, donde se pudieron observar células confluentes con EB's ovoides sobre y próximas

a las mismas. Posteriormente, se realizó un *merge* de las células sin filtro y con el filtro I3 donde se observó la fluorescencia dada por el fluorocromo del anticuerpo dirigido a *C. trachomatis* (ver Figura 3C).

**Figura 3.** Detección de EB's de *C. trachomatis* con Inmunofluorescencia directa sobre células HEp-2 utilizando el anticuerpo policlonal *ab21211*.



**A.** Control negativo: se observa ausencia de fluorescencia por parte del Anticuerpo *ab21211*, se observan únicamente núcleos teñidos de azul con Hoechst. En las células infectadas se observan estructuras verde fluorescentes sobre citoplasmas celulares y cercanos al núcleo, correspondientes a EB's de *C. trachomatis* reconocidos con el anticuerpo *ab21211*. **B.** Imagen capturada sin filtros (con luz blanca), donde se observan células confluentes con formas de gran tamaño sobre y próximas a las mismas. El *merge* con el anticuerpo se observan estas estructuras clamidiales fluorescentes en el interior de las células.

## Discusión

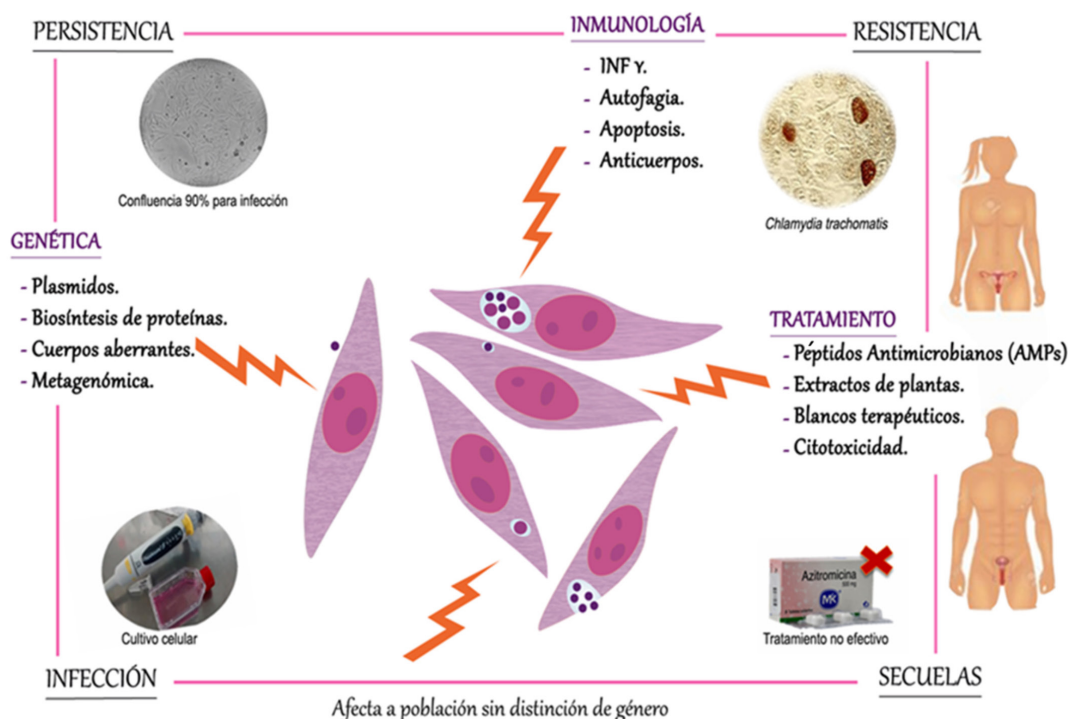
Los modelos de líneas celulares utilizados en investigación permiten simular procesos fisiológicos que dan información y ayudan

a resolver diferentes interrogantes en áreas del conocimiento antes de requerir un modelo *in vivo*; así mismo, el establecer modelos de infección permiten aclarar diferentes interrogantes en investigación. En este es-

tudio se realizó la infección de la línea celular HEp-2 con EB's de *C. trachomatis*, con el fin de contar con un modelo de estudio para futuros proyectos que permitan generar conocimiento sobre los procesos que

realiza esta bacteria intracelular y poder ser empleada en nuevos estudios en áreas como inmunología, genética, procesos de persistencia/resistencia y tratamiento (ver Figura 4).

**Figura 4.** Perspectivas en investigación sobre *Chlamydia trachomatis*.



*C. trachomatis* serovar L2, aplicaciones orientadas a diferentes áreas del conocimiento y la investigación tales como genética, inmunología y terapia, considerando aquellos factores característicos del microorganismo en cuestión.

En este estudio, la línea celular HEp-2 fue cultivada en medio DMEM modificando el porcentaje de SFB al 20% y agregando gentamicina a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire para obtener una confluencia del 90% a las 24 horas. En el estudio realizado por Pajaniradje y cols. (9) se reportó que las células HEp-2 se pueden mantener en medio DMEM suplementado con 10% SFB, a 37°C en una incubadora

humificada con una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de O<sub>2</sub>, condiciones similares a las establecidas en este estudio. Por otro lado, el estudio realizado por Shubach y cols. (10) mostró que las células HEp-2 pueden ser cultivadas en medio MEM Gibco® y DMEM: F12 en una concentración de SFB entre 5% y 10%, con presencia de glutamina al 1%. Estos estudios muestran cómo los requerimientos nutricionales son de impor-

tancia para establecer el cultivo de la línea celular y generar un crecimiento apropiado que sea requerido en cada estudio propuesto como se observó en los ensayos realizados en este estudio.

El uso de gentamicina como antibiótico, es indicado en cultivos para infección con *C. trachomatis*. Antibióticos como la penicilina y la estreptomycin comúnmente utilizados inhiben el desarrollo de este microorganismo en cultivos. A su vez, es preciso destacar que la gentamicina se utiliza rutinariamente para inhibir el crecimiento bacteriano extracelular; en este caso, *C. trachomatis* al replicarse dentro de una vacuola única donde no se fusiona con organelos endocíticos o lisosómicos, no se encuentra expuesta a daño celular por dicho antibiótico. Por lo tanto, el medio de cultivo suplementado con gentamicina puede usarse sin ningún inconveniente, considerando que la gentamicina no puede cruzar las membranas de mamíferos y no entra en contacto con el cuerpo reticulado, y aunque pueda internalizarse en las células de los mamíferos por pinocitosis, las vesículas pinocíticas tampoco se fusionan con las vacuolas que contienen a *C. trachomatis* (11-13). Así mismo, es fundamental resaltar el trabajo de Coico (14), quien hace mención del uso de gentamicina.

Por otro lado, el uso de soluciones tales como SPG y HBSS no afectan la monocapa celular. La unión células-EB's y la invasión a estas son clave para el desarrollo de *C. trachomatis* y su patogenia. Al presentarse una interrupción puede llegar a ser inhibida la

infección, resaltando la importancia de un cultivo de células confluyente y una infectividad EB's-célula adecuada (14).

De igual manera, en estudios donde se realizan procesos de infección, se muestra el uso del SPG para la dilución de cuerpos elementales y como medio de transporte para *C. trachomatis*, y el HBSS para lavados de las monocapas (8, 15, 16) donde se emplean una o ambas soluciones durante el proceso de infección y para el mantenimiento de los EB's, igual a lo realizado en el protocolo de infección en este estudio. No obstante, en otras investigaciones se omite el uso de estas soluciones y los protocolos de infección son modificados en algunos procesos como centrifugación asistida para favorecer la infección (11, 17). Al añadir los cuerpos elementales, estos se incubaron a 37°C sin centrifugación para evitar algún efecto sobre el proceso infección-adhesión celular. Sin embargo, Al-Zeer y cols. (18), de acuerdo a la especie de *Chlamydia* describen el uso o no de centrifugación como requerimiento para la infección. En este caso, no influyó el realizar un proceso de centrifugación y optar por un proceso de incubación de EB's con células HEp-2 a temperatura de 37°C, según se pudo comprobar al realizar la tinción de Giemsa a las monocapas de células HEp-2 infectadas con el microorganismo.

La infección celular con EB's de *C. trachomatis* es un proceso en donde es importante mantener una infectividad cuerpo elemental-célula. Las inclusiones de *C. trachomatis* pueden fusionarse si dos bacterias infectan

una sola célula huésped, por lo que la detección de *C. trachomatis* por Giemsa se ha utilizado para observar la presencia de inclusiones citoplasmáticas de líneas celulares infectadas con esta bacteria. En el trabajo de Giakoumelou y cols. (19), células estromales del endometrio fueron infectadas con *C. Trachomatis* y los signos de infección se revelaron a partir de inclusiones teñidas de color púrpura mediante la tinción de Giemsa, lo cual se asemeja a este ensayo, dado que los cuerpos elementales son observados de esta tonalidad, próximos a las células HEp-2.

Por otro lado, las células teñidas con Giemsa, tal como lo muestra el estudio realizado por Soysa y cols. (20), tras ser infectadas exhiben cambios característicos en la morfología celular que indican la muerte apoptótica y daño en células HEp-2, al observarse por microscopía óptica después de ser tratadas con el extracto de la planta semecarpus donde se añadió un volumen de Giemsa diluido (1: 9, pH7,2, 5µL) a las células durante 10 minutos (20). Lo que difiere para este caso, ya que tras probar las variables se determinó un tiempo de exposición de 60 minutos añadiendo un volumen de Giemsa (30:1, pH7,2, 300µL) (21). Comprobándose que la tinción de Giemsa es una herramienta útil para poder observar las estructuras celulares y evaluar la infección con *C. trachomatis*.

La técnica de inmunofluorescencia permitió confirmar la presencia de *C. trachomatis* en células HEp-2. Los resultados obteni-

dos se pueden comparar con la tinción de Giemsa en cuanto al tamaño de la partícula infecciosa. En estudios como el de Cochran y cols. (21), donde evaluaron la infección en células HEC1-A con el serovar L2 (VR-902B) de *C. trachomatis* y la demostraron con inmunofluorescencia, los cuerpos de inclusión se observan de gran tamaño (análogo al núcleo celular) siendo similar a lo encontrado en este estudio. De igual manera, el trabajo de Nogueira y cols. (22) en células HaCaT con *C. trachomatis* serovar L2, donde las inclusiones de Chlamydia parecían maduras (22).

El establecer un modelo de infección de *C. trachomatis* abre las puertas para realizar nuevos ensayos en diferentes áreas de la investigación para contribuir al conocimiento científico, aplicándolo en estudios (23-26), como la reducción de tamaño de los RB's al dividirse antes de su conversión a EB's (26) y regulación de la extrusión como mecanismo de liberación de *C. trachomatis* (27).

### *Perspectivas en investigación sobre C. trachomatis.*

Establecer un modelo de infección de *C. trachomatis* permite realizar ensayos en diferentes áreas de la investigación con el fin de contribuir a dar solución a diferentes interrogantes. Este modelo de investigación básica permite realizar diferentes estudios sobre este microorganismo; así mismo, poder evaluar diversidad de factores morfológicos, genéticos, inmunológicos y de tratamiento.

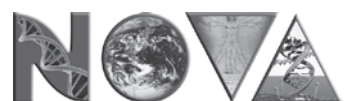
Considerando que este microorganismo afecta a la población sin distinción de género, sexualmente activa, relacionándose con enfermedades de importancia y secuelas dada su persistencia en el organismo y la resistencia a los antibióticos con los que actualmente es tratada (ver Figura 4).

## Referencias

1. Ramírez N Gloria, Vera A. Víctor J, Villamil J, Luis C. Cultivos Celulares, Elemento Fundamental para la Investigación. Revista Acovez. 2018;24(1).
2. Toolan HW. Transplantable human neoplasms maintained in cortisone-treated laboratory animals: H.S. No. 1; H.Ep. No. 1; H.Ep. No. 2; H.Ep. No. 3; and H.Emb.Rh. No. 1. Cancer research. 1954;14(9):660-6.
3. Instituto nacional de seguridad y salud en el trabajo. Chlamydia trachomatis- Fichas de agentes biológicos- DB-B-C.tr-16 España2016 [cited 2017]. Available from: <https://www.insst.es/documentos/94886/353495/Chlamydia+trachomatis+2017.pdf/471a1569-928f-4c86-938b-9afd06ee-360f?version=1.0>.
4. Cardona-Arias JA, Gallego-Atehortúa LH, Ríos-Orsorio LA. Infección por Chlamydia trachomatis en pacientes de una institución de salud de Bogotá y Medellín, 2012-2015. Revista chilena de infectología. 2016;33:513-8.
5. MARTÍNEZ T. MA. Diagnóstico microbiológico de Chlamydia trachomatis: Estado actual de un problema. Revista chilena de infectología. 2001;18:275-84.
6. ATCC. Chlamydia trachomatis (ATCC® VR-902B™) 2019 [cited 2017 8 abril 2017]. Available from: [https://www.atcc.org/en/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/Viruses/Chlamydia\\_and\\_Rickettsia/VR-902B.aspx](https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Viruses/Chlamydia_and_Rickettsia/VR-902B.aspx).
7. Jutinico Shubach AP, Mantilla Galindo A, Sánchez Mora RM. Regulación de la familia de proteínas BCLL-2 en células infectadas con Chlamydia Trachomatis. Nova. 2015;13:83-92.
8. Engstrom P, Bergstrom M, Alfaro AC, Syam Krishnan K, Bahnan W, Almqvist F, et al. Expansion of the Chlamydia trachomatis inclusion does not require bacterial replication. International journal of medical microbiology : IJMM. 2015;305(3):378-82.
9. Pajaniradje S, Mohankumar K, Pamidimukkala R, Subramanian S, Rajagopalan R. Antiproliferative and apoptotic effects of Sesbania grandiflora leaves in human cancer cells. BioMed research international. 2014;2014:474953.
10. Jutinico Shubach A, Malagón Garzón E, Sánchez Mora R. Cultivo de la línea celular HEP-2: doblaje poblacional y coloración con Giemsa Perspectivas para el estudio de la infección con Chlamydia trachomatis. Nova. 2013;11:23-33.
11. Nans A, Saibil HR, Hayward RD. Pathogen-host reorganization during Chlamydia invasion revealed by cryo-electron tomography. Cellular microbiology. 2014;16(10):1457-72.
12. da Cunha M, Pais SV, Bugalhao JN, Mota LJ. The Chlamydia trachomatis type III secretion substrates CT142, CT143, and CT144 are secreted into the lumen of the inclusion. PloS one. 2017;12(6):e0178856.
13. Derrick T, Last AR, Burr SE, Roberts CH, Nabicasa M, Cassama E, et al. Inverse relationship between microRNA-155 and -184 expression with increasing conjunctival inflammation during ocular Chlamydia trachomatis infection. BMC infectious diseases. 2016;16:60.
14. Richard Coico. Current Protocols in Microbiology. 2006 2019. In: Wiley Microbiology & Virology [Internet]. Available from: <https://www.wiley.com/en-co/Current+Protocols+in+Microbiology-p-9780471729242>.



15. Vicetti Miguel RD, Henschel KJ, Duenas Lopez FC, Quispe Calla NE, Cherpes TL. Fluorescent labeling reliably identifies *Chlamydia trachomatis* in living human endometrial cells and rapidly and accurately quantifies chlamydial inclusion forming units. *Journal of microbiological methods*. 2015;119:79-82.
16. Ibane JA, Sherchand SP, Fontanilla FL, Nagamatsu T, Schust DJ, Quayle AJ, et al. *Chlamydia trachomatis*-infected cells and uninfected-bystander cells exhibit diametrically opposed responses to interferon gamma. *Scientific reports*. 2018;8(1):8476.
17. Becker E, Hegemann JH. All subtypes of the Pmp adhesin family are implicated in chlamydial virulence and show species-specific function. *MicrobiologyOpen*. 2014;3(4):544-56.
18. Al-Zeer MA, Al-Younes HM, Lauster D, Abu Lubad M, Meyer TF. Autophagy restricts *Chlamydia trachomatis* growth in human macrophages via IFNG-inducible guanylate binding proteins. *Autophagy*. 2013;9(1):50-62.
19. Giakoumelou S, Wheelhouse N, Brown J, Wade J, Simitsidellis I, Gibson D, et al. *Chlamydia trachomatis* infection of human endometrial stromal cells induces defective decidualisation and chemokine release. *Scientific reports*. 2017;7(1):2001.
20. Soysa P, Jayarthne P, Ranathunga I. Water extract of *Semecarpus parvifolia* Thw. leaves inhibits cell proliferation and induces apoptosis on HEp-2 cells. *BMC complementary and alternative medicine*. 2018;18(1):78.
21. Cochrane M, Armitage CW, O'Meara CP, Beagley KW. Towards a *Chlamydia trachomatis* vaccine: how close are we? *Future microbiology*. 2010;5(12):1833-56.
22. Nogueira AT, Braun KM, Carabeo RA. Characterization of the Growth of *Chlamydia trachomatis* in In Vitro-Generated Stratified Epithelium. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017;7:438.
23. Carrera Páez LC, Pirajan Quintero ID, Urrea Suarez MC, Sanchez Mora RM, Gómez Jiménez M, Monroy Cano LA. Comparación del cultivo celular de HeLa y HEp-2: Perspectivas de estudios con *Chlamydia trachomatis*. *Nova*. 2015;13:17-29.
24. Gutiérrez DL, Sánchez Mora RM. Tratamientos alternativos de medicina tradicional para *Chlamydia trachomatis*, agente causal de una infección asintomática. *Nova*. 2018;16:65-74.
25. Jutinico Shubach, A., González Devia, J., & Sánchez Mora, R. (2017). Asociación de HSP60 de *Chlamydia trachomatis* y desarrollo de cáncer de ovario. *NOVA*, 15(28), 57 - 68. <https://doi.org/10.22490/24629448.2079>
26. Rodríguez Rojas, F. A., Barreto Ordoñez, P. S., & Sánchez Mora, R. M. (2016). Detección de *Chlamydia trachomatis* en hombres que tienen sexo con hombres en Bogotá: un estudio piloto. *NOVA*, 14(26), 17-27. <https://doi.org/10.22490/24629448.1747>
27. Sherrid AM, Hybiske K. *Chlamydia trachomatis* Cellular Exit Alters Interactions with Host Dendritic Cells. *Infection and immunity*. 2017;85(5).
28. Nguyen PH, Lutter EI, Hackstadt T. *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein MrcA interacts with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 (ITPR3) to regulate extrusion formation. *PLoS pathogens*. 2018;14(3):e1006911.



**NOVA Publicación Científica  
en Ciencias Biomédicas**

# Detección de un mosaico de trisomía 21 en líquido amniótico

## Detection of a mosaicism of trisomy 21 in amniotic liquid

María Paula Prieto <sup>1</sup>, María Ximena Arteaga <sup>2</sup>, Isabel Fernandez <sup>3</sup>, Sharon Lechtig <sup>4</sup>, Carolina Ciro <sup>5</sup>,  
Valentina Maldonado <sup>6</sup>, Luis Gustavo Celis <sup>7</sup>

### Resumen

Se analizó un resultado con alteración cromosómica tomado de una base de datos conformada por un total de 4755 muestras de líquido amniótico extraídos mediante amniocentesis con indicación de su médico tratante, riesgo sérico y edad materna avanzada. En este reporte se presenta la detección de un mosaico de trisomía 21 en líquido amniótico, mediante la técnica de Banda G donde se analizaron 20 metafases. Los resultados obtenidos documentan una composición cromosómica 47, XY+21 y 46, XY con una relación 9:11 respecto a las metafases analizadas, confirmándose así el diagnóstico del Síndrome de Down secundario a mosaico.

**Palabras claves:** Síndrome de Down, mosaicismo, cariotipo anormal, técnicas de cultivo celular, diagnóstico prenatal, asesoramiento genético.

---

1. Facultad de Medicina. Universidad de La Sabana, Chía, Colombia.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4710-9105>

2. Facultad de Medicina. Universidad de La Sabana, Chía, Colombia.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9036-2766>

3. Unidad de Genética Médica. Policlínica Metropolitana, Caracas, Venezuela.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4268-2639>

4. Facultad de Medicina. Universidad de La Sabana, Chía, Colombia.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6292-8742>

5. Facultad de Medicina. Universidad de La Sabana, Chía, Colombia.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9593-2788>

6. Facultad de Medicina. Universidad de La Sabana, Chía, Colombia.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9036-2766>

7. Facultad de Medicina. Universidad de La Sabana, Chía, Colombia.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0338-6258>

Correspondencia: [luiscelis@unisabana.edu.co](mailto:luiscelis@unisabana.edu.co)

## Abstract

A result with chromosomal alteration was analyzed from a database consisting of a total of 4755 samples of amniotic fluid extracted by amniocentesis with indication of the attending physician, serum risk and advanced maternal age. This report presents the detection of a mosaicism of trisomy 21 in amniotic fluid, using G- Banding where 20 metaphases were analyzed. The results obtained document a chromosomal composition 47, XY + 21 and 46, XY with a 9:11 ratio with respect to the metaphases analyzed, confirming the diagnosis of Down syndrome secondary to mosaicism.

**Keywords:** Down's Syndrome, Mosaicism, Abnormal Karyotype, Cell Culture Techniques, Prenatal Diagnosis, Genetic Counseling.

## Introducción

La trisomía 21, llamada comúnmente síndrome de Down (SD), es la aneuploidía más común a nivel mundial y la principal causa de discapacidad cognitiva de origen genético (1). La prevalencia de SD difiere de un país a otro y, a veces, de un distrito a otro dentro del mismo país. Sin embargo; según la Organización Mundial de la Salud, la incidencia global predecible generalmente es de 1 a 10/1000 nacidos vivos en todo el mundo (2). En Colombia se estima que la incidencia está en 17,82 por cada 10.000 nacidos vivos, promedio un poco mas bajo del promedio de Latinoamérica el cual está en 18,8 por cada 10.000 nacidos vivos (3).

Es probable que las personas afectadas tengan una serie de afecciones médicas que afectan los sistemas cardíaco, digestivo y respiratorio. Las causas más comunes de mortalidad en el SD son las enfermedades respiratorias (neumonía), enfermedades

cardíacas congénitas, trastornos circulatorios y demencia (4).

Desde una perspectiva epidemiológica, otros dos trastornos son importantes porque se ha informado un exceso tanto en los individuos afectados como en sus madres: la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de la tiroides (5).

La enfermedad cuenta con variantes citogenéticas que cambian las manifestaciones clínicas de la enfermedad. La trisomía 21 es la variante más común, presente en el 95% de los casos. Sin embargo, la enfermedad se puede presentar secundaria a translocación robertsoniana, mosaicismo y trisomía parcial (6,7,8).

El diagnóstico prenatal y postnatal de este síndrome se realiza mediante el cariotipo, a través del cual se identifica con exactitud la

variante citogenética, y permite realizar una adecuada asesoría genética, en especial en la evaluación del posible riesgo de aparición de nuevos casos en la familia (1). Con base en lo anterior, la amniocentesis, como parte del diagnóstico prenatal citogenético, cobra vital importancia al ser el método principal para la identificación de anomalías cromosómicas, ya sea estructurales o de número (9).

El objetivo de este trabajo es describir un caso de mosaico de trisomía 21 documentado en líquido amniótico, de una paciente con 37 años y 17 semanas de gestación, en quien se indicó el análisis citogenético ante edad materna avanzada.

### **Metodología**

Se toma una base de datos conformada por un total de 4755 líquidos amnióticos obtenidos mediante amniocentesis con indicación de su médico tratante y previo consentimiento informado, riesgo sérico y edad materna avanzada, no presentando antecedentes familiares de enfermedades genéticas ni consanguinidad. Las muestras de líquido amniótico seleccionada (líquido claro y punción única), se le procedió a centrifugar a 800 rpm, descartando el sobrenadante y posteriormente las células se resuspendieron hasta 3 mililitros en medio de cultivo celular (Chang Amnio, Irvine Scientific) y colocado en incubadora de CO<sub>2</sub> (5%) y temperatura de 37 °C durante 7 días, posteriormente a esta células se les procedió a

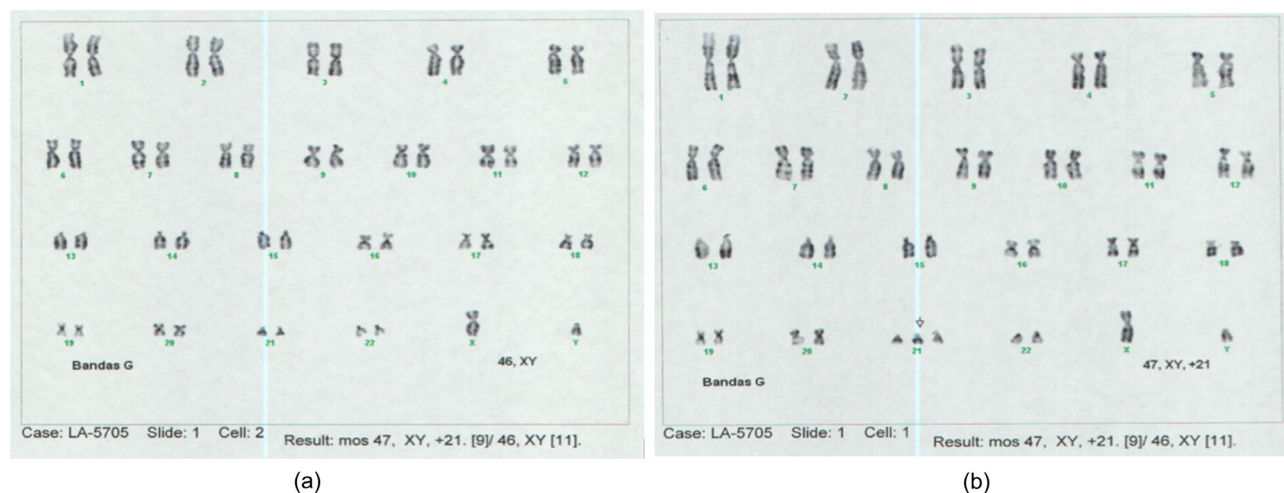
realizar el Bando de las láminas mediante la técnica de Banda G y se analizaron 20 metafases.

### **Resultados**

Al analizar los 4755 líquidos amnióticos, se identificaron 263 casos que presentaban anomalías cromosómicas, encontrándose 40 anomalías de tipo estructural (deleciones, inversiones, translocaciones y duplicaciones), y 211 anomalías del tipo numéricas (aneuploidías y poliploidías). Una de las muestras presentó una composición cromosómica 47, XY+21 y 46, XY con una relación 9:11 de las metafases analizadas, el cual corresponde a un mosaico de trisomía 21, la cual culminó en la pérdida de la gestación durante el segundo trimestre (ver Figura 1b).



**Figura 1.** Cariotipo de células extraídas de muestra de líquido amniótico. Composición cromosómica 46, XY (a) y 47, XY+21 (b). Mosaico de trisomía 21.



## Discusión

Existen las siguientes variantes citogenéticas causantes del SD: la *trisomía 21*, que constituye el 90-95% de los casos, con cariotipo 47, XX o XY +21; las *translocaciones robertsonianas*, presentes en el 4% de los casos donde se da un re-arreglo de un cromosoma 21 con otro de los cromosomas acrocéntricos (de los grupos D o G), con un cariotipo 46, XX o XY, rob(D o G;21)(q10;q10),+21 (6,7). Finalmente, existe una variante menos común dada por *mosaicismo*, presente en aproximadamente el 1% de los casos, donde existen dos o más líneas celulares diferentes en el mismo individuo. Finalmente se puede encontrar la *trisomía parcial*, presente en menos del 1% de los casos, se genera en la región 21q22.3, con cariotipo 46,XX o XY,dup(21)(q22.3) (8).

El caso presentado presenta un paciente con SD causado por una variante citoge-

nética poco habitual. El mosaico 21 es una forma de presentación que corresponde aproximadamente al 1% de los casos con esta enfermedad. Se estima que la incidencia de mosaicismo en síndrome de Down va desde 1 en 16.670 hasta 1 en 41.670 nacidos vivos (6).

Se han descrito múltiples factores de riesgo para el SD. El principal factor de riesgo es la edad materna avanzada. La prevalencia de los nacimientos aumenta rápidamente con la edad, particularmente después de los 30 años. En consecuencia, la edad materna promedio en los nacimientos con SD es aproximadamente 5 años mayor que los nacimientos no afectados (5). Sin embargo, en un estudio realizado en 29.000 pacientes, de los cuales 322 casos eran mosaicismos, se evidenció que la distribución de la edad materna para los casos de trisomía 21 con

mosaicismo difiere de la simple trisomía 21, con madres mucho más jóvenes (10). Alrededor de dos tercios de los diagnósticos de trisomía 21 con mosaicismo parecen tener los mismos riesgos asociados con la edad que la trisomía 21 simple, mientras que un tercio parece ser independiente de la edad materna. Esto indica que hay otro factor involucrado en la presencia de mosaicismo no asociado con la edad materna (10). En el caso presentado, al evidenciar que ninguno de los padres presentó aneuploidías, se cree que el factor de riesgo más probable fue la edad materna avanzada. No obstante, se necesitan más estudios para determinar factores de riesgo asociados a la aparición de esta variante citogenética en particular.

El aborto es la complicación más frecuente en la gestación, cerca del 10-15% de los embarazos clínicamente reconocidos terminan en abortos espontáneos y aproximadamente el 50% de estas pérdidas son secundarias a anomalías genéticas (tanto en número como estructura) (11,12,13). Este evento genético puede enfocarse a través de dos puntos de vista: anomalías genéticas de los progenitores y anomalías genéticas fetales. La primera contribuye a un mayor riesgo de aborto espontáneo en embarazos sucesivos incluyendo alteraciones en el cariotipo, condiciones de carácter dominante o recesivo, así como mutaciones en genes responsables de la coagulación o el metabolismo de folatos; y en la segunda, encontramos condiciones de novo y mutaciones heredadas. Se estima que el 50% de los

abortos espontáneos en el primer trimestre son por cromosomopatías de novo (14,15). La mitad de los abortos espontáneos tempranos (<12 semanas de edad gestacional) son causados por anomalías cromosómicas fetales, y casi un tercio en los abortos espontáneos del segundo trimestre como se informó en una revisión anterior (16). Los estudios citogenéticos han demostrado que la mayoría de estas anomalías son anomalías cromosómicas numéricas (86%), y una minoría de los casos es causada por anomalías cromosómicas estructurales (6%) y mosaicismo cromosómico (8%) (16). Sin embargo, no hay estudios que demuestren una relación directa entre el aborto temprano y la presencia de un mosaico de trisomía 21.

Si bien el SD secundario a mosaicismo no es el más frecuente, se ha demostrado que es subdiagnosticado, debido a que, aparte del reto para el diagnóstico clínico, existen desafíos para su diagnóstico a nivel de técnicas citogenéticas. En caso de un mosaicismo con una baja proporción de la línea celular alterada, las manifestaciones fenotípicas son sutiles y conducen a falla en el reconocimiento mediante el examen físico. En la literatura se estima que solo el 37,5% de estos pacientes con esta variante citogenética se detectan por las manifestaciones clínicas (17). Adicionalmente, aparte del reto para el diagnóstico clínico a nivel de técnicas diagnósticas citogenéticas lo es también. Al tomar muestras de un solo tejido y una cantidad tan pequeña, el sesgo de no detección aumenta, sumado a que el

número de células evaluadas es insuficiente para detectar las líneas celulares comprometidas si la relación es baja (6,17,18).

El síndrome de Down, siendo la aneuploidía más frecuente en el ser humano, es la principal causa de discapacidad cognitiva de origen genético (1); los pacientes con esta condición tienen un fenotipo caracterizado por talla baja, obesidad, pliegue palmar único, hipotonía, entre otros (19). Sin embargo, debido a la variabilidad citogenética causante de esta enfermedad, la presentación clínica es diversa y depende de la presencia de múltiples factores genéticos en especial en el caso de los mosaicismos (20). Las manifestaciones clínicas del SD debido a mosaicismo son muy diversas, desde una presentación fenotípica comparable a la de los individuos que tienen trisomía 21 sin mosaico hasta un fenotipo que pasaría desapercibido y no sugestivo de alguna alteración (6). En los casos que se presentan manifestaciones fenotípicas sutiles, puede ocurrir una falla en el reconocimiento mediante el examen físico (17). Adicionalmente, se cree que estas diferencias fenotípicas reflejan principalmente un número variable de células trisómicas en diferentes personas, así como la variación de tejido a tejido dentro de una persona (6).

En este contexto, el diagnóstico prenatal es una herramienta comúnmente utilizada para identificar anomalías cromosómicas, a través de la aplicación de pruebas diagnósticas invasivas y no invasivas que permiten determinar tempranamente altera-

ciones genéticas. Dentro de las anteriores, la amniocentesis con el subsecuente cultivo celular y realización de cariotipo es la técnica que más se realiza dado su bajo índice de riesgo, tanto para la madre como para el feto, por encima de otros procedimientos como la biopsia de vellosidades coriales (21,22,23). Sin embargo, no es una prueba exenta de riesgos como la pérdida de la gestación, el trabajo de parto pretérmino y la ruptura prematura de membranas, entre otros (22, 24).

Cuando se identifica una alteración cromosómica en líquido amniótico, es necesario brindar asesoría genética estricta por el médico genetista a los progenitores. Esta actividad debe incluir necesariamente información a los padres sobre el diagnóstico, el pronóstico del producto, las opciones de seguimiento o terminación del embarazo, también allí se abordan las medidas que deberán tomarse al momento del nacimiento, así como la evaluación del riesgo de recurrencia de enfermedades hereditarias (9,22). La literatura recomienda que en estos casos si la gestación llega a término, el cariotipo debe repetirse al nacimiento sobre todo en aquellos casos en que el estudio quedó inconcluso, o para corroborar el origen de la alteración y poder brindar una asesoría genética adecuada (9).

## Referencias

1. Vergara Estupiñán E. J. , Forero-Castro R. M, Moreno Granados J. I. Estudio descriptivo-transversal del síndrome de Down en pacientes de Boyacá (Colombia). *Revista Ciencia en Desarrollo*. 2014; 5 (2): 187-195.
2. Mohammed Al-Biltagi. Down syndrome from Epidemiologic Point of View. *EC Paediatrics*. 2015; 2: 82-91.
3. Nazher J, Cifuentes L. Malformaciones congénitas en Chile y Latino América: Una visión epidemiológica del ECLAMC del período 1995-2008. *Rev Med Chile*. 2011; 139(1): 72-78.
4. Arumugam A, Raja K, Venugopalan M, Chandrasekaran B, Kovanur Sampath K, Muthusamy H et al. Down syndrome-A narrative review with a focus on anatomical features. *Clin Anat*. 2016; 29(5): 568-77.
5. Cuckle H, Arbuzova S. Epidemiology and Genetics of Human Aneuploidy. En: Leung P, Human Q. *Reproductive and Prenatal Genetics*. 1ª ed. Reino Unido: American Press; 2019. p. 529-551.
6. Papavassiliou P, Charalsawadi C, Rafferty K, Jackson-Cook C. Mosaicism for trisomy 21: A review. *Am J Med Genet A*. 2015; 167A(1): 26-39.
7. Frías S, Ramos S, Molina B, del Castillo V, Mayén DG. Detection of mosaicism in lymphocytes of parents of free trisomy 21 offspring. *Mutation Research*. 2002; 520 (1): 25-37.
8. Hultén MA, Patel SD, Tankimanova M, Westgren M, Papadogiannakis N, Jonsson AM. On the origin of trisomy 21 Down syndrome. *Molecular Cytogenetics*. 2008; 1: 21.
9. Giraldo A, Arias A, León MC, Fernández I, Celis LG. Triploidía (69 xxx): reporte de caso. *Revista de Medicina e Investigación UAEMéx*. 2018; 6 (1): 23-27.
10. Morris JK. Trisomy 21 mosaicism and maternal age. *Am J Med Genet A*. 2012; 158A (10): 2482-4.
11. Dória S, Carvahlo F, Ramalho C, et al. An efficient protocol for the detection of chromosomal abnormalities in spontaneous miscarriages or fetal deaths. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009; 147: 144-150.
12. Chan-Wei J, Li W, Yong-Lian L, Rui S, Li-Yin Z, Lan Y et al. Aneuploidy in Early Miscarriage and its Related Factors. *Chinese Medical Journal*. 2015; 128 (20): 2272-2776.
13. Warburton D. Cytogenetics of reproductive wastage: from conception to birth. *Medical Cytogenetics*. 2000; 213-246.
14. Simpson JL. Causes of fetal wastage. *Clin Obstet Gynecol*. 2007; 50: 10-30.
15. Kacprzak M, Chrzanowska M, Skoczylas B, Moczułska H, Borowiec M, Sieroszewski P. Genetic causes of recurrent miscarriages. *Ginekologia Polska*. 2016; 87(1): 722-726.
16. Van den Berg MM, Van Maarle MC, Van Wely M, Goddijn M. Genetics of early miscarriage. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1822(12): 1951-9.
17. Devlin L, Morrison PJ. Accuracy of the clinical diagnosis of Down syndrome. *Ulster Med J*. 2004; 73: 4-12.
18. Chen CP, Wang YL, Chern SR, Wu PS, Chen YN, Chen SW et al. Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization of low-level true mosaicism for trisomy 21 using uncultured amniocytes. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2016; 55(2): 285-7.
19. Asim A, Kumar A, Muthuswamy S, Jain S, Agarwal S. Down syndrome: an insight of the disease. *Journal of Biomedical Science*. 2015; 22: 41- 50.
20. Díaz-Cuéllar S, Yokoyama-Rebollar E, Del Castillo-Ruiz V. Genómica del síndrome de Down. *Acta pediátrica de México*. 2016; 37(5): 289-296.
21. Krstic N, Obic'an S. Current landscape of prenatal genetic screening and testing. *Birth Defects Res*. 2019;1-11.

22. Gómez-Puente V, Esmer-Sánchez M, Quezada-Espinoza C, Martínez-de Villarreal C. Estudio citogenético en líquido amniótico, Experiencia de 7 años en la Facultad de Medicina y Hospital Universitario, UANL. *Medicina Universitaria*. 2012; 14: 23-29.
23. Torres, C., Usta, C., Mancilla, L., Fernández, I., & Celis, L. (2018). Diagnóstico prenatal de inversión pericéntrica del cromosoma cinco de novo en una paciente con gestación a término sin complicaciones posteriores. *NOVA*, 16(30), 75-80. <https://doi.org/10.22490/24629448.2837>
24. Chang HP, Chion JY, Chen JY, Su PH. Prenatal cytogenetic diagnosis in Taiwan: a nationwide population-based study. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2017; 30(21): 2521-2528.



# Caracterización geométrica euclidiana y fractal de células falciformes

## Geometric euclidean and fractal characterization of sickle cells

Javier Oswaldo Rodríguez-Velásquez <sup>1</sup>, Martha Leonor Castillo-Bohórquez <sup>2</sup>, Ana Lucía Oliveros-Rozó <sup>3</sup>,  
María-Yolanda Soracipa-Muñoz <sup>4</sup>, Signed Esperanza Prieto-Bohórquez <sup>5</sup>

### Resumen

**Introducción.** Estudios recientes proponen nuevas metodologías que permiten hacer el reconocimiento de las diferentes alteraciones en la forma de los glóbulos rojos, estableciendo patrones de comparación matemáticos y geométricos en el contexto de la geometría fractal y euclidiana. **Objetivo.** Caracterizar la forma de las células falciformes mediante una metodología diseñada en el contexto de la geometría fractal y euclidiana. **Metodología.** Se realizó un reconocimiento de 30 imágenes de células falciformes en frotis de sangre periférica. Las células falciformes fueron delineadas y se superpusieron dos rejillas Kp de 5 x 5 píxeles y Kg de 10 x 10 píxeles, para calcular el espacio ocupado por estas células y la dimensión fractal mediante el método de Box Counting. **Resultados.** Los espacios ocupados por las células falciformes variaron con la superposición de la rejilla de Kp entre 36 y 56; la superficie de células falciformes varió entre 969 y 1872 píxeles y las proporciones entre la superficie y los valores de la rejilla Kp variaron entre 23.1 y 39.6. **Conclusiones.** El presente estudio revela la posibilidad de hacer caracterizaciones más precisas en las células falciformes, a partir de los espacios de ocupación de estas, al superponer la rejilla Kp y las proporciones entre la superficie, y no mediante los valores de la dimensión fractal, contribuyendo de esta manera en el diseño de metodologías que mejoren el reconocimiento de este tipo de células.

1. Investigador principal del Grupo Insight. Bogotá, Colombia.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4585-3010>

2. Investigadora principal del Grupo Eritron. Docente, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá, Colombia.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6729-1357>

3. Investigadora Grupo Eritron. Docente, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá, Colombia.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2581-4871>

4. Investigadora Grupo Insight. Bogotá, Colombia.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7997-6561>

5. Investigadora Grupo Insight. Bogotá, Colombia.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7896-231X>

Correspondencia: [grupoinight2025@yahoo.es](mailto:grupoinight2025@yahoo.es)

**Palabras claves:** fractales, hematología, glóbulo rojo, célula.

## Abstract

**Introduction.** Recent studies propose new methodologies that allow the recognition of the different alterations in the shape of red blood cells, establishing mathematical and geometric comparison patterns in the context of fractal and Euclidean geometry. **Objective.** To characterize the shape of sickle cells using a methodology designed in the context of fractal and Euclidean geometry. **Methodology.** 30 images of sickle cells were obtained in peripheral blood smears. The sickle cells were delineated and two grids were superimposed (Kp of 5 x 5 pixels and Kg of 10 x 10 pixels), to calculate the space occupied by these cells and the fractal dimension by means of the Box Counting method. **Results.** The spaces occupied by the sickle cells varied with the superposition of the Kp grid between 36 and 56; the surface of sickle cells varied between 969 and 1872 pixels, and the proportions between the surface and the values of the Kp grid varied between 23.1 and 39.6. **Conclusions.** The present study reveals the possibility of making more precise characterizations in sickle cells, from the occupation spaces of the sickle cell by superposing the Kp grid and the proportions between the surface and the Kp grid, and not by the values of the fractal dimension, contributing in this way in the design of methodologies that improve the recognition of this type of cells.

**Keywords:** Fractals, Hematology, Red Blood Cell, Cell.

## Introducción

Un objeto geométrico regular puede ser caracterizado en un plano de dos o tres dimensiones, en el primer caso se puede analizar la superficie y en el segundo el volumen. En cambio, un objeto de la naturaleza se caracteriza por su irregularidad, lo que ha implicado en la actualidad la necesidad de considerar nuevos conceptos y nociones matemáticas y geométricas que permitan medir esta irregularidad. La geometría fractal ha logrado tal finalidad, al proporcionar métodos para medir el grado de irregularidad de un objeto, mediante la dimensión

fractal (1). Los objetos de esta geometría reciben el nombre de objetos fractales, que por su configuración geométrica pueden ser deterministas o indeterministas (o estocásticos) como son los objetos de la naturaleza, que reciben el nombre de fractales salvajes (2). La reproducción de este grupo de fractales, ha implicado introducir parámetros aleatorios, los cuales se caracterizan por generar modificaciones e irregularidades en su estructura (3). En la actualidad diferentes estructuras del cuerpo humano han sido caracterizadas desde el contexto de la geo-

metría fractal. Uno de los métodos utilizados para medir el grado de irregularidad de un fractal salvaje, es el de Método de Box Counting (2). Este método ha sido aplicado para caracterizar estructuras como son las arterias coronarias en un modelo experimental de restenosis, en ventriculogramas, células preneoplásicas y en las diferentes alteraciones de los glóbulos rojos (4-11).

La variación en la forma del glóbulo rojo normal, implica un reporte de anormalidad en la muestra de extendido de sangre periférica, dando indicios de una posible enfermedad (12). Dentro del grupo de trastornos hereditarios de los glóbulos rojos se encuentra la anemia de células falciformes o anemia drepanocítica. Se trata de una enfermedad de origen genético de herencia autosómica recesiva caracterizada por la presencia de hemoglobina S en la cual ocurre una sustitución del aminoácido ácido glutámico por valina en la posición seis de la cadena  $\beta$  de la hemoglobina. Puede presentarse de manera homocigota (Hb SS) o heterocigota, presentándose varias combinaciones, tales como Hb AS, HbSC, HbS-Talasemia. Cuando disminuye la tensión de oxígeno, la hemoglobina S se polimeriza y los glóbulos rojos toman una forma falciforme o forma de Hoz o media luna característica. Esta forma favorece la oclusión de la microcirculación lo que da origen a una anemia hemolítica y crisis vaso-oclusiva dolorosa que causa la sintomatología propia de la enfermedad (13). Otra característica de los drepanocitos, es que son considerados causantes de la obstruc-

ción del flujo sanguíneo cuando estos transitan por pequeños vasos (14). La comprensión de las alteraciones en la morfología de los glóbulos rojos, continúa siendo un problema clásico en la biología celular y en las últimas cuatro décadas también ha atraído la atención de otras ciencias para la ayudar a la identificación (15).

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, se han propuesto nuevos estudios que plantean caracterizar la estructura irregular de las alteraciones de los glóbulos rojos (6-11), sin las asociaciones morfológicas establecidas en los textos de hematología (16) en las que dichas células son equiparadas con figuras geométricas regulares como son el círculo, la elipse, la esfera, entre otras; logrando establecer una metodología diagnóstica para los glóbulos rojos y sus alteraciones, mediante la diferenciación lograda para los eritrocitos normales y sus diferentes alteraciones (6), así como para los equinocitos y esferocitos (7-11) a partir de los espacios ocupados con la rejilla Kp, la superficie de cada célula y la proporción entre la superficie y la rejilla Kp. Después de lo anteriormente expuesto, el presente estudio tiene como propósito realizar una caracterización en la geometría de las células falciformes, midiendo para ello los espacios ocupados por la superficie de estas células en el contexto de la geometría euclidiana y fractal en el espacio de Box Counting.

## Metodología

**Método de Box Counting:** se trata de un procedimiento matemático diseñado para calcular la dimensión fractal de fractales salvajes. Se consideran en este estudio las células falciformes como parte de este grupo de fractales. El cálculo se establece mediante la siguiente ecuación (ver Ecuación 1):

$$D = \frac{\text{Log}N(2^{-(K+1)}) - \text{Log}N(2^{-K})}{\text{Log}2^{k+1} - \text{Log}2^k} = \text{Log}_2 \frac{N(2^{-(k+1)})}{N(2^{-k})}$$

Siendo K el grado de partición de la cuadrícula (o rejillas), N el número de espacios que contiene el contorno del objeto y D la dimensión fractal.

**Rejillas de 5x5 y 10x10 píxeles:** se trata de un conjunto de cuadros diseñado en píxeles, en donde la cuadrícula de 5x5 píxeles, se denomina rejilla de cuadros pequeños (Kp) y la cuadrícula de 10x10 píxeles, rejilla de cuadros grandes (Kg).

**Superficie (S):** representa el número de píxeles que tocan el interior de la imagen de las células falciformes.

## Procedimiento

Se realizó un reconocimiento de 30 imágenes de células falciformes en frotis de sangre periférica. Estas imágenes fueron reconocidas en el laboratorio de Hematología de la Universidad Colegio Mayor de Cundina-

marca, según los criterios morfológicos de la célula.

La técnica de tinción utilizada para observar los glóbulos rojos fue colorante de Wright. El microscopio utilizado para hacer el reconocimiento fue con Olympus con un objetivo de 100x y un aumento ocular de 10x. Las imágenes de células falciformes fueron tomadas por una Cámara Canon de microscopio digital. Posteriormente, todas las fotografías fueron editadas en Microsoft Office Professional Plus 2010, con el fin de que todas tengan una misma escala de medida de 500 x 333 píxeles.

A continuación, fue delineado el contorno de cada una de las células falciformes tal y como se puede observar en la Figura 1. Seguidamente, fueron superpuestas las dos rejillas, para calcular mediante el método de Box Counting simplificado, el espacio ocupado por las células falciformes y posteriormente establecer su dimensión fractal (ver definiciones y Figura 2). La caracterización de las células falciformes se realizó a partir de los espacios ocupados por cada una de las células al superponer la rejilla Kp, tal y como se ha realizado en otros estudios (9-11). Adicionalmente, fueron considerados los valores en píxeles de la superficie de cada célula y la proporción entre la superficie y los cuadros ocupados por las células falciformes al superponer la rejilla de cuadros pequeños (S/Kp).

## Resultados

Los espacios ocupados por las células falciformes con la rejilla Kp variaron entre 36 y 56, con la rejilla Kg entre 17 y 29. La dimensión fractal de las células falciformes varió entre 0.726 y 1.152 (ver tabla 1). La superficie de las células falciformes varió entre 969 y 1872 píxeles y la proporción entre S/Kp varió entre 23.1 y 39.6. El análisis de los resultados revela que los espacios ocupados al superponer las dos rejillas y la superficie de las células falciformes permite hacer la caracterización de las células falciformes. En cambio, los valores individuales de la dimensión fractal en el presente estudio no permiten caracterizar las células. Un ejemplo de esto se puede observar en los valores de la dimensión fractal de la célula falciforme No. 4 y 9 de la Tabla 1 cuyo valor de la dimensión fractal dio como resultado 1,000. Al observar los espacios ocupados por las células al superponer la rejilla Kp y Kg arroja valores distintos, evidenciando una vez más por qué no se considera los valores de la dimensión fractal para hacer distinciones matemáticas y geométricas en este tipo de estructuras.

Las Figuras 1 y 2 permiten observar los pasos previos que son requeridos para aplicar el método de Box Counting, el cual consiste en delinear la célula, para posteriormente superponer las dos rejillas (Kp y Kg), para el cálculo de la dimensión fractal. Se tomaron como ejemplo las imágenes de las

células falciformes 1 y 20 de la Tabla 1, para detallar paso a paso la aplicación del método de Box Counting.

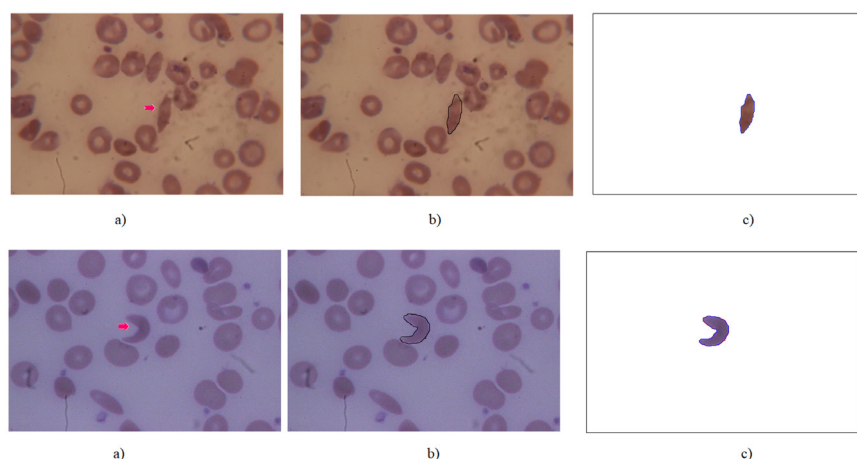
**Tabla 1.** Resultados de células falciformes representativas del total de células medidas en el contexto de la geometría euclidiana y fractal.

No.	Kp	Kg	Df	S	S/Kp
1	38	19	1,000	1152	30,3
2	45	22	1,032	1164	25,9
3	45	23	0,968	1223	27,2
4	42	21	1,000	1213	28,9
5	45	23	0,968	1043	23,2
6	42	19	1,144	1050	25,0
7	43	20	1,104	1198	27,9
8	51	26	0,972	1411	27,7
9	40	20	1,000	1184	29,6
10	42	20	1,070	969	23,1
11	40	18	1,152	996	24,9
12	36	17	1,082	1425	39,6
13	43	26	0,726	1265	29,4
14	56	29	0,949	1872	33,4
15	43	23	0,903	1647	38,3
16	40	22	0,862	1263	31,6
17	39	18	1,115	1264	32,4
18	43	23	0,903	1390	32,3
19	45	21	1,100	1116	24,8
20	51	27	0,918	1559	30,6

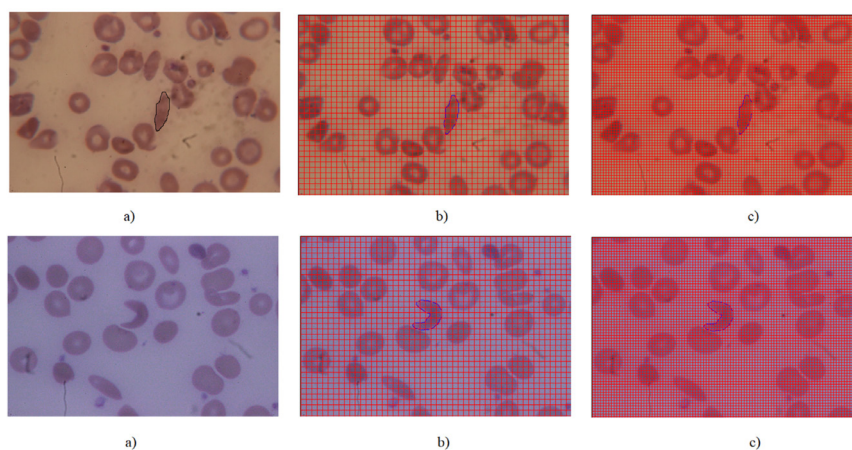
Donde, Kp: es en número de cuadros ocupados por las células falciformes al superponer la rejilla de 5 x 5 píxeles. Kg: es en número de cuadros ocupados por las células falciformes al superponer la rejilla de 10 x 10 píxeles. Df: es la dimensión fractal; S: superficie en píxeles. S/Kp: la proporción entre la superficie y el número ocupados con la rejilla Kp.



**Figura 1.** Imagen de extendido de sangre periférica que corresponde a la célula falciforme No. 1 y No. 20. a) La flecha indica una célula falciforme reconocida y seleccionada para ser medida; b) la célula falciforme delineada; c) célula falciforme delineada y separada del resto de los eritrocitos que aparecen en la imagen.



**Figura 2.** Superposición de rejillas Kp y Kg, en el extendido de sangre periférica en donde se encuentra la célula falciforme No. 1 y No. 20. a) célula falciforme seleccionada y delineada; b) superposición de la rejilla Kg (10 x 10 píxeles) en la célula falciforme; c) superposición de la rejilla Kp (5 x 5 píxeles) en la célula falciforme delineada.



## Discusión

Este es el primer trabajo que caracteriza el grado de irregularidad de las células falciformes, mediante los espacios ocupados al superponer la rejilla Kp, los valores de la superficie y las proporciones  $S/Kp$ , a partir de una metodología fundamentada en

el contexto de la geometría fractal y euclidiana. En la literatura médica es muy común encontrar la asociación de la célula falciforme o drepanocitos con la forma que tiene una herramienta agrícola denominada ‘hoz’, para diferenciar esta célula

del resto de alteraciones en la forma de los eritrocitos. En cambio, el presente estudio realizó una caracterización matemática directa con la forma irregular de estas células mediante los espacios ocupados por la superficie de estas células en el contexto de la geometría euclidiana y fractal en el espacio de Box Counting. Los resultados de este estudio contribuyen a generar un nuevo sistema de medida que faciliten el reconocimiento de estas células en muestras de sangre periférica.

La caracterización de las diferentes alteraciones en la morfología de los glóbulos rojos en el contexto de la geometría fractal y euclidiana, fueron posibles de realizar en la medida que se encontraron patrones matemáticos diferenciadores para cada una de estas irregularidades, lo cual contribuye a precisar el reconocimiento de estas diferentes alteraciones (6-11). Desde esta nueva línea de investigación se encontró que los espacios de ocupación de los esferocitos evaluados con la rejilla Kp son menores al ser comparados estos valores con los espacios de ocupación de los glóbulos rojos normales. Adicionalmente se encontró que los valores de las proporciones S/Kp de estos dos tipos de glóbulos rojos permiten establecer diferencias matemáticas y geométricas (11), y no los valores de la dimensión fractal tal y como se ha encontrado en estudios previos (6-11). Esta primera caracterización realizada en la forma de las células falciformes es el primer aporte al área de la hematología con la cual se pueden refinar los estudios llevados a cabo

en el reconocimiento de este tipo de células. En un futuro estudio se planteará la realización de una comparación matemática entre los glóbulos rojos normales y las células falciformes con el fin de establecer diferencias geométricas y matemáticas entre ambas células mediante los espacios de ocupación y las proporciones S/Kp.

Describir los hematíes según su tamaño, con los métodos clásicos de hematología requiere de mucho tiempo para su aplicación diaria (17). Uno de los primeros estudios propuestos para medir el tamaño de los eritrocitos fue diseñado por Price-Jones, en el cual estableció una técnica que buscaba un patrón que caracterizara la heterogeneidad de los diámetros de los eritrocitos, y de esta manera se estableciera un medio para evaluar la forma de los glóbulos rojos en la salud y la enfermedad (17-19). En los analizadores de hematología se realiza un conteo sanguíneo completo automatizado, en estos analizadores se calcula el ancho de distribución de los glóbulos rojos, y es uno de los parámetros de rutina más disponibles. Este parámetro indica la variación en el volumen de glóbulos rojos y en su empleo se pueden detectar grados sutiles de anisocitosis (19). Sin embargo, algunos estudios han mostrado discrepancias en las interpretaciones de estos resultados (19).

El reconocimiento de la morfología celular es uno de los principios claves en la formación de los futuros profesionales. Desde esta perspectiva, un estudio llevado a cabo

en 47 pacientes con anemia de células falciformes, describieron la forma de las células como redondas u ovales, un número variable de células de forma irregular, alargadas y estrechas con extremos redondos o puntiagudos (20). Los resultados del presente estudio revelan la posibilidad del reconocimiento de las diferentes alteraciones de las células falciformes, a partir de la caracterización matemática de su forma irregular, permitiendo tener una medida cuantitativa, mejorando las caracterizaciones cualitativas logradas mediante analogías con figuras euclidianas. Esto permitirá al especialista caracterizar la estructura irregular celular de forma directa, evitando realizar caracterizaciones basadas en simulaciones de estas estructuras, que en la mayoría de los casos se alejan de la realidad del objeto medido.

En el espacio generalizado de Box Counting, se ha logrado caracterizar la morfología de otras estructuras como son los diferentes grados de alteración en las células de cuello uterino y establecer posteriormente metodologías diagnósticas de aplicación clínica (21). También se ha caracterizado arterias coronarias normales hasta re-estenosis en un modelo experimental de porcino (4). De igual modo, el comportamiento de la dinámica cardíaca de adulto y neonatal simulada mediante atractores cardíacos, los estados de normalidad y anormalidad, así como la evolución a estos agudos, han sido diferenciados a partir de los espacios que ocupa el atractor cardíaco (22,23). Desde esta línea de investigación se ha lo-

grado establecer los primeros parámetros matemáticos que predicen casos mortalidad analizando el comportamiento de la dinámica cardíaca (24). También, se han logrado predicciones en otras áreas como son la biología molecular (25), la epidemiología (26) y la infectología (27).

### Agradecimientos

El presente trabajo hace parte de los productos alcanzados para el proyecto aprobado por la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca según acuerdo No. 86 del 2018.

### Referencias

1. Mandelbrot B. The Fractal Geometry of Nature. San Francisco: Freeman Ed; 1972. p. 341-348.
2. Peitgen H, Jurgens H, Saupe D. Limits and self similarity. In: Chaos and Fractals: New Frontiers of Science. N.Y. Springer-Verlag; 1992. p. 129-172.
3. Bruce T. M. Spatial Aggregation and Neutral Models in Fractal Landscapes, The American Naturalist, 1992; 139(1): 32-57.
4. Rodríguez J, Prieto S, Correa C, Bernal P, Puerta G, Vitery S, et al. Theoretical generalization of normal and sick coronary arteries with fractal dimensions and the arterial intrinsic mathematical harmony. BMC Medical Physics. 2010; 10:1-6.
5. Rodríguez J, Prieto S, Soracipa Y, Correa C, Forero G, Cifuentes R, Aguirre G, Salamanca A, Bernal H. Generalización diagnóstica fractal de la morfología cardíaca ventricular izquierda: anormalidades moderadas y severas a partir del ventriculograma. Universitas Médica. 2018; 59(1):1-9.

6. Correa C, Rodríguez J, Prieto S, Álvarez L, Ospino B, Munévar A, et al. Geometric diagnosis of erythrocyte morphophysiology. *J. Med. Med. Sci* 2012; 3(11): 715-720.
7. Rodríguez J, Prieto S, Correa S, Mejía M, Ospino B, Munevar Á, et al. Simulación de estructuras eritrocitarias con base en la geometría fractal y euclidiana. *Arch Med (Manizales)*, 2014; 14(2): 276-284.
8. Rodríguez J, Moreno N, Alfonso D, Méndez M, Flórez A. Caracterización Geométrica de la morfología del Equinocito. *Arch Med*. 2017;13(1):1-5.
9. Rodríguez J, Soracipa Y, Ovalle A, Castro M, Snejoa N, Quijano B, et al, Geometría fractal aplicada para comparar los espacios ocupados por eritrocitos normales y esferocitos. *Archivos de Medicina*. 2018; 1:13-23.
10. Rodríguez J, Escobar S, Abder L, del Río J, Quintero L, Ocampo D. Nueva metodología geométrica para evaluar la morfología del eritrocito normal. *Nova* 2017; 15(27), 37-43.
11. Rodríguez J, Soracipa Y, Ovalle A, Castro M, Snejoa N, Quijano B, et al, Geometría fractal aplicada para comparar los espacios ocupados por eritrocitos normales y esferocitos. *Archivos de Medicina*. 2018; 1:13-23.
12. Juliania A, Biesa A, Boydstonb C, Taylorb R, Margaret S. Sereno. Navigation performance in virtual environments varies with fractal dimension of landscape. *Journal of Environmental Psychology*, 2016; 47:115-16.
13. Carr J. Atlas de la hematología. Bogotá: Panamericana. 2009.
14. CDS. Información básica sobre la enfermedad de células falciformes. Disponible en: <https://www.cdc.gov/ncbddd/spanish/sicklecell/facts.html>
15. Mukhopadhyay R, Gerald Lim H W, Wortis M. Echinocyte Shapes: Bending, Stretching, and Shear Determine Spicule Shape and Spacing. *Biophys J* 2002; 82(4): 1756-1772.
16. Campuzano G. Utilidad clínica del extendido de sangre periférica: los eritrocitos. *Medicina & laboratorio*. 2008; 14(7-8): 311-313.
17. Miale J.B. Hematología medicina de laboratorio. Barcelona: Editorial reverté S.A. 1985.
18. Price-Jones, C. (1933). *Red Blood Cell Diameters*. Oxford University Press, London.
19. Constantino B. Red Cell Distribution Width, Revisited. *Laboratory Medicine*. 2013;44(Issue 2):e2-e9.
20. Diggs L.W., Bibb J. The erythrocyte in sickle cell anemia morphology, size, hemoglobin content, fragility and sedimentation rate. *JAMA*. 1939;695-701.
21. Velásquez J, Prieto S, Catalina C, Dominguez D, Cardona DM, Melo M. Geometrical nuclear diagnosis and total paths of cervical cell evolution from normality to cancer. *J Cancer Res Ther* 2015; 11(Issue 1): 98-104.
22. Rodríguez J, Prieto S, Correa C, Domínguez D, Pardo J, Mendoza F, Soracipa Y, Olarte N, Cardona D, Mendez L. Clinic application of a cardiac diagnostic method based on dynamic systems theory. *Res. J. Cardiol*. 2017; 10.
23. Rodríguez J, Prieto S, Flórez M, Alarcón C, López R, Aguirre G, et al. Physical-mathematical diagnosis of cardiac dynamic on neonatal sepsis: predictions of clinical application. *J. Med. Sci* 2014; 5(5): 102-108.
24. Rodríguez J. Dynamical systems applied to dynamic variables of patients from the intensive care unit (ICU): Physical and mathematical mortality predictions on ICU. *J. Med. Med. Sci* 2015; 6(8):209-220.
25. Rodríguez J, Bernal P, Álvarez L, Pabón S, Ibáñez S, Chapuel N, et al. Predicción de unión de péptidos de MSP-1 y EBA-140 de plasmodium falciparum al HLA clase II Probabilidad, combinatoria y entropía aplicadas a secuencias peptídicas. *Inmunología* 2010; 29(3):91-99.

26. Rodríguez J. Método para la predicción de la dinámica temporal de la malaria en los municipios de Colombia. *Rev Panam Salud Pública* 2010; 27(3):211-8.
27. Rodríguez J, Prieto S, Correa C, Forero M, Pérez C, Soracipa Y, et al. Teoría de conjuntos aplicada al recuento de linfocitos y leucocitos: predicción de linfocitos T CD4 de pacientes con VIH/SIDA. *Inmunología*. 2013; 32(2): 50-56.



# Actividad *in vitro* de los extractos etanólicos de *Lantana camara* L., *Petiveria alliacea* L. y *Lippia dulcis* T. frente a bacterias patógenas

*In vitro* activity of the ethanolic extracts from *Lantana camara* L., *Petiveria alliacea* L. and *Lippia dulcis* T. against pathogenic bacteria

Nahir Alejandra Navarrete Barragán <sup>1</sup>, Erika Fadime Pita-Ospina <sup>2</sup>, Ruth Mélida Sánchez Mora <sup>3</sup>, Sara Emilia Giraldo Quintero <sup>4</sup>, María Consuelo Bernal Lizarazú <sup>5</sup>

## Resumen

**Introducción.** La biodiversidad colombiana y los saberes tradicionales permiten la exploración de plantas medicinales con potencial actividad antimicrobiana que podrían usarse para tratamiento de infecciones. **Objetivos.** Determinar la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de *Lantana camara* L., *Petiveria alliacea* L. y *Lippia dulcis* T. sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6380 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. **Materiales y métodos.** Se realizó la adquisición del material vegetal y caracterización botánica, se obtuvieron los extractos etanólicos por percolación y se realizó caracterización fitoquímica preliminar mediante cromatografía en capa delgada (CCD). Se evaluó la actividad antibacteriana, mediante pruebas de difusión con disco y difusión en agar en concentraciones de 1mg/mL y 2mg/mL; para extractos activos se estableció la Concentración Inhibitoria mínima (CIM) y Concentración Mínima Bactericida (CMB). Para análisis estadístico se realizó prueba t de Student. **Resultados y discusión.** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue sensible con *Lantana camara* L. y *Lippia dulcis* T. siendo este último activo también sobre *Proteus vulgaris* ATCC 6380 con efecto inhibitorio superior al 50%. El extracto de *Lippia dulcis* T. presentó la mayor actividad

1. Bacterióloga, Universidad de Pernambuco.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8336-9764>

2. Bacterióloga, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9042-2586>

3. Bacterióloga, M.Sc genética, Ph.D Ciencias. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0572-8418>

4. Química Farmacéutica, Ph.D. Ciencias Farmacéuticas. Universidad Nacional Abierta y a Distancia.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6652-8869>

5. Médica, Bacterióloga. M.Sc Microbiología, Mg Salud pública y desarrollo social. Docente Universidad Nacional Abierta y a Distancia.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9049-1629>

Correspondencia: maria.bernal@unad.edu.co

inhibitoria sobre *S. aureus* (CMI: 1,95 mg/mL). Ningún extracto mostró actividad sobre *Escherichia coli* ni *Pseudomonas aeruginosa*. Metabolitos secundarios, especialmente terpenoides y cumarinas fueron detectados en *L. dulcis*. **Conclusiones.** El estudio muestra que productos naturales derivados de plantas medicinales como los extractos etanólicos de *Lantana camara* y *Lippia dulcis*, presentan actividad antibacteriana sobre *S. aureus* y *P. vulgaris* y podrían ser alternativa promisorio para tratamiento de infecciones bacterianas.

**Palabras claves:** Etnofarmacología, extractos vegetales, antimicrobianos, antibacterianos, plantas medicinales, biodiversidad.

### Abstract

**Introduction.** Colombian biodiversity and traditional knowledge allow the exploration of medicinal plants with potential antimicrobial activity, which could be used to treat infections. **Objectives.** To determine the antibacterial activity of ethanolic extracts of *Lantana camara* L., *Petiveria alliacea* L. and *Lippia dulcis* T. on *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6380 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. **Materials and methods.** Performed the acquisition of plant material and botanical characterization, ethanolic extracts were obtained by percolation and preliminary phytochemical characterization was performed by thin layer chromatography (CCD). The antibacterial activity was evaluated by disc diffusion and agar diffusion tests at concentrations of 1mg/mL and 2mg/mL; for active extracts, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (CMB) were established. For statistical analysis, Student's t test was performed. **Results and discussion.** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was sensitive with *Lantana camara* L. and *Lippia dulcis* T. The latter being also active on *Proteus vulgaris* ATCC 6380 with inhibitory effect higher than 50%. The extract of *Lippia dulcis* T. had the highest inhibitory activity on *S. aureus* (MIC: 1.95 mg/mL). No extract showed activity on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Secondary metabolites, especially terpenoids and coumarins were detected in *L. dulcis*. **Conclusions.** The study shows that natural products derived from medicinal plants such as the ethanolic extracts of *Lantana camara* and *Lippia dulcis* have antibacterial activity on *S. aureus* and *P. vulgaris* and could be a promising alternative for the treatment of bacterial infections.

**Keywords:** Ethnopharmacology, Plant Extracts, Anti-Infective Agents, Anti-Bacterial Agents, Medicinal Plants, Biodiversity.

## Introducción

Las enfermedades infecciosas son consideradas un importante problema de salud pública, debido a que representan altas tasas de morbilidad y mortalidad, y están relacionadas con fenómenos subyacentes como el inadecuado saneamiento básico y la emergente resistencia a los antimicrobianos (1). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades infecciosas y parasitarias causaron durante el año 2015, 5.7 millones de defunciones a nivel mundial y más de 195.000 muertes en la región de las Américas (2).

Los antibióticos son una herramienta fundamental para combatir las enfermedades infecciosas, y desde su aparición han permitido disminuir la morbimortalidad asociada a estas patologías de forma significativa (3). A pesar de que la terapia antimicrobiana ocupa un lugar prominente en los avances de las ciencias médicas, se destaca la inminente y progresiva capacidad de los microorganismos para desarrollar resistencia a los diferentes agentes antimicrobianos (4). Los antibióticos se consideran recursos sanitarios no renovables, ya que el ritmo de crecimiento de la resistencia sobrepasa al de la incorporación de nuevas familias de antibióticos (5-6). Sin embargo, es posible investigar y desarrollar nuevas alternativas de tratamiento para las enfermedades infecciosas, dentro de las cuales se encuentran los productos naturales.

La OMS estima que cerca del 80% de la población en países en vía de desarrollo (especialmente del continente africano), utiliza la medicina tradicional (MT) para satisfacer sus necesidades primarias en salud y que cuando la MT emplea tratamientos, incluye el uso de medicinas a base de hierbas, partes de animales y/o minerales. Adicionalmente, la OMS reporta que en Colombia un 40% de la población utiliza la medicina tradicional (7). Colombia se encuentra catalogada como uno de los 14 países que alberga el mayor índice de biodiversidad en la tierra (8). Se estima que el territorio colombiano alberga aproximadamente 27,860 especies de plantas, de las cuales 2,400 son catalogadas como plantas medicinales (9).

La riqueza cultural y natural del territorio colombiano ha conducido a la realización de diversos estudios etnobotánicos enfocados en la descripción del uso tradicional de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Dentro de los estudios sobre plantas medicinales cabe mencionar los realizados por Ruiters y cols. en África (10), Pinheiro y cols. en Brasil (11) y Savithramma y cols. en India (12). Referente a estudios sobre el uso de plantas medicinales en mercados populares en Colombia, se resalta el de Giraldo y cols. (13).

La familia Verbenaceae a la cual pertenecen plantas como *Lantana cámara* y *Lippia dul-*

*cis*, comprende alrededor de 35 géneros y 1000 especies distribuidas principalmente en los trópicos y subtrópicos (14). Son ampliamente usadas en la medicina tradicional de diferentes países para el tratamiento de enfermedades parasitarias y trastornos respiratorios e inflamatorios. También se les han atribuido propiedades antimicrobianas, las cuales están directamente relacionadas con su amplia composición fitoquímica (15). Por su parte, *Petiveria alliacea*, se distribuye por lo general en regiones tropicales de América, como Centroamérica, las islas del Caribe, la selva Amazónica, México, Brasil, Colombia y Argentina, así como en regiones específicas de África. En la medicina tradicional se resaltan diferentes usos, entre ellos como diurético, antiespasmódico, analgésico, antiinflamatorio, antihelmíntico y para desordenes del sistema nervioso central. Dentro de sus propiedades antimicrobianas etnobotánicas se resaltan para infecciones cutáneas, urinarias, venéreas y del tracto respiratorio, además antifúngicas y antisépticas (16). Diferentes compuestos activos se han reportado; sin embargo, su composición es variable dependiendo del lugar y época de recolección y de la parte del material de donde se han aislado. Se resaltan petiverina A y petiverina B (diastereoisómeros del sulfóxido de S-bencil-cisteína), los cuales se encuentran en alta proporción en las raíces en comparación con las hojas y los tallos. En las raíces la actividad de la enzima sulfóxido de cisteína liasa sobre las petiverinas promueve mediante la formación de diferentes intermediarios la formación de compuestos trisulfuro (bencil-hi-

droxi-etil-trisulfuro, dibencil trisulfuro) a los cuales se les han atribuido propiedades antimicrobianas (17).

Bajo este contexto, se han realizado diversos estudios orientados a la búsqueda de plantas medicinales de interés fitoquímico y farmacológico que pueden presentar actividad antimicrobiana sobre patógenos de interés en salud pública, tal como la evaluación de la actividad *in vitro* de extractos vegetales frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas procedentes de aislamientos clínicos y Cepas Multidrogo-resistentes (MDR) implicadas en infecciones del tracto urinario como los realizados por Mishra y cols. (18) y Marasini y cols (19) y la investigación de Ulloa y cols (20) sobre la actividad antimicrobiana de plantas nativas peruanas frente a *Pseudomonas aeruginosa*, encontrando resultados prometedores.

Recientemente han sido publicadas investigaciones relacionadas con las plantas de interés del presente estudio, dentro de las cuales cabe destacar la de Ochoa y cols. (21), donde extractos obtenidos a partir de hojas secas y frescas de *Petiveria alliacea* L. demostraron actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por otra parte, Naz y Bano (22) reportaron que el extracto metanólico de hojas de *Lantana camara* L. presentó la máxima actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por su parte, Regnier y cols. (23)

establecieron que aceites esenciales de *Lippia escaberrima* causaron la inhibición del crecimiento micelial y actividad fungistática.

El presente estudio se realizó con el fin de contribuir a la búsqueda de sustancias de origen natural como alternativa para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, evaluando la potencial actividad antibacteriana de extractos etanólicos obtenidos de *Lantana camara* L., *Petiveria alliacea* L. y *Lippia dulcis* T. sobre las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6380 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

## Material y métodos

### Material vegetal

El material vegetal fue adquirido en el mercado popular de la “Plaza de mercado de Paloquemao” en la ciudad de Bogotá, D.C. a partir de los reportes de Giraldo y cols. (13). Se adquirieron alrededor de 2 kg de material fresco de las plantas “sanguinaria”, “orozul” y “anamú”. Al menos 3 ejemplares de cada especie fueron depositados en las condiciones requeridas para su identificación taxonómica en el Herbario Nacional Colombiano de la Universidad Nacional de Colombia, donde se encuentran depositados con los nombres de *Lantana camara* L. (s.l.) No. COL 585817; *Petiveria alliacea* L. No. COL 585819 y *Phyla dulcis* (Trevir.) Moldenke No. COL

585816. Según identificación taxonómica anterior realizada en el Herbario de Plantas Útiles de Colombia (HPUJ), *Phyla dulcis* (Trevir) Moldenke y *Lippia dulcis* (Trevir), son nombres sinónimos de la especie *Phyla scaberrima* (Juss. ex Pers.) Moldenke. Para este estudio se contempló *Lippia dulcis* T. debido a que por lo general los reportes científicos se refieren a este género.

### Extracción

El material fresco de cada planta fue llevado a proceso de secado en estufa de aire circulante manteniendo a 40°C de 48 a 72 horas. De acuerdo con estudios etnobotánicos previos, se seleccionaron las partes aéreas de “sanguinaria” y “orozul” (hojas, flores y tallos), mientras que para “anamú” sólo se seleccionaron las hojas (24).

Los extractos vegetales se obtuvieron mediante extracción sólido-líquido (percolación) a presión atmosférica y temperatura ambiente hasta agotamiento, empleando etanol grado técnico al 96% como solvente. Para el proceso de percolación se sometieron 445.0g de material vegetal seco y pulverizado de *L. dulcis*, 381.0g de *P. alliacea* y 566.0g de *L. camara*. Posteriormente, los extractos secos se obtuvieron mediante rotaevaporador a vacío, a una temperatura entre 40°C a 50°C, obteniendo rendimientos del 8,15%, 9,30% y 9,77% para *L. dulcis*, *L. camara* y *P. Alliacea*, respectivamente, con respecto al material vegetal seco. Parte de los extractos obtenidos se reservaron para la realización de las pruebas fitoquímicas pre-



liminares y de actividad antibacteriana y se mantuvieron refrigerados, protegidos de la humedad y la luz.

### *Análisis fitoquímico preliminar*

A los extractos etanólicos se les realizó una caracterización fitoquímica preliminar mediante cromatografía en capa delgada (CCD) empleando placas de sílica gel 60 (Macherey Nagel ® F254, 0,25 mm) y patrones de referencia: Quinidina (alcaloides), 7-hidroxicumarina (cumarinas y/o antraquinonas),  $\beta$ -citosterol (esteroides y/o terpenoides) y quercetina (flavonoides). Se emplearon 10.0mg/mL para los extractos y alrededor 1.0 a 5.0mg para los patrones de referencia. Como fase móvil (FM) se emplearon mezclas Cloroformo:Metanol (90:10) y/o Hexano: Acetato de Etilo (60:40). Una vez eluidas, las placas se revelaron mediante luz visible y UV (a 254 y/o 365nm) y reveladores químicos universales y específicos según lo establecido por Wagner y Bladt (25). Se tuvieron también en cuenta las recomendaciones del CYTED (26). Los resultados se valoraron de forma semicuantitativa, según la apreciación subjetiva de la intensidad de color según lo propuesto por Sanabria (27): Coloración intensa: (+++); coloración claramente observable: (++); coloración débil (+); reacción negativa y/o no se observa coloración (-).

### *Determinación de la actividad antimicrobiana*

En el estudio fueron utilizadas las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Es-*

*cherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6380 y *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 25923, las cuales fueron proporcionadas por el cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y conservadas a -20°C en medio Brain Heart Infusion (BHI) con adición de glicerol al 10%.

Se realizaron curvas de crecimiento de cada una de las bacterias seleccionadas, con el objetivo de establecer el tiempo de incubación necesario para alcanzar su fase exponencial de crecimiento, y definir la absorbancia correspondiente a una densidad bacteriana de  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Para ello se utilizaron cultivos bacterianos en agar Mueller Hinton y se tomaron de 3 a 5 unidades formadoras de colonias (UFC), las cuales fueron transferidas a caldo Mueller Hinton. Se ajustó la suspensión al estándar 0.5 de McFarland, utilizando espectrofotometría; y, finalmente, se realizó la lectura de la absorbancia inicial de la suspensión a 600nm y se incubó a 37°C, realizando la lectura de la absorbancia cada hora, durante 12 horas consecutivas, teniendo en cuenta el protocolo de Cappuccino y cols., con algunas modificaciones (28). Posterior a los periodos de incubación establecidos, se determinó el recuento de unidades formadoras de colonias, para lo cual se utilizaron diluciones seriadas en agua peptonada 0.1% en un rango de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  (28, 29). El procedimiento se realizó por duplicado y se establecieron las respectivas gráficas del crecimiento para cada cepa.

### *Pruebas de sensibilidad antimicrobiana*

Se realizaron antibiogramas en agar Mueller Hinton a cada una de las bacterias en estudio según las directrices del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), a partir de cultivos bacterianos en caldo Mueller Hinton con una densidad equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/mL (30). A partir de los ensayos se estableció como control positivo Gentamicina (10 µg) y como control de negativo Dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%, v/v en agua estéril (31). Las pruebas con los extractos vegetales se realizaron mediante las técnicas de difusión con discos y difusión en agar.

#### *Difusión con discos*

Las pruebas de difusión con discos se desarrollaron teniendo en cuenta los protocolos propuestos por Othman y cols. (32) y Andrews y cols. (33). 24 horas previas al experimento, discos en blanco (Oxoid™) fueron impregnados con 20 µL de cada extracto vegetal a evaluar en concentraciones de 1 mg/mL (para un primer ensayo) y 2 mg/mL (para un segundo ensayo), preparados a partir de una solución stock en DMSO al 10%, así como también se impregnaron discos con 20 µL del control positivo y negativo. Posteriormente, se dejaron secar durante 24 horas a temperatura ambiente en condiciones de esterilidad.

Colonias de las cepas respectivas que crecieron en agar Mueller Hinton fueron seleccionadas y cultivadas en caldo Mueller

Hinton hasta alcanzar una densidad de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. 100 µL de cada cultivo bacteriano equivalentes  $1 \times 10^7$  UFC/mL, se sembraron en agar Mueller Hinton, distribuyendo uniformemente con la ayuda de un hisopo estéril por siembra masiva y se colocaron en la superficie del medio los discos impregnados con cada extracto vegetal, un disco de control negativo y un disco de control positivo. Los medios fueron incubados a 37°C por 24 horas y los ensayos se realizaron por triplicado. Posterior a la incubación, se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento (mm) y se calculó el porcentaje del efecto inhibitorio relativo respecto al control positivo, aplicando la Ecuación 1:

$$\% \text{ Efecto inhibitorio} = \frac{\text{Media diámetro del halo de inhibición} \times 100}{\text{Diámetro del halo de inhibición control Positivo}}$$

#### *Difusión en agar*

El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo propuesto por Othman y cols. (32) y Cruz y cols. (34). En cada placa de agar Mueller Hinton, se realizaron cinco perforaciones (pozos) de 10 mm de diámetro con un sacabocados estéril y, posteriormente, cada pozo fue sellado con 0.1 mL del mismo agar para evitar la dispersión del extracto y los controles; 100 µL de cada cepa bacteriana (con una densidad de  $1 \times 10^8$  UFC/mL, equivalentes a  $1 \times 10^7$  UFC/mL) fueron sembrados masivamente en la superficie del medio. Se adicionó a cada pozo 20 µL de cada uno de los extractos vegetales en concentraciones de 1 mg/mL

(para el primer ensayo) y 2mg/mL (para el segundo ensayo), preparados a partir de una solución stock en DMSO al 10%. Se empleó un pozo para el control negativo y un pozo más para el control positivo. Las cajas se incubaron a 37°C por 24 horas y los ensayos se realizaron por triplicado. La actividad antibacteriana se determinó midiendo el diámetro de la zona de inhibición (mm) y se calculó el porcentaje del efecto inhibitorio relativo respecto al control positivo aplicando la Ecuación 1.

### *Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)*

Para determinar la CMI de los extractos que presentaron actividad antimicrobiana, se realizó la prueba de macrodilución en caldo de acuerdo con el protocolo de Abadie y cols. (35). Se emplearon cultivos bacterianos en caldo Mueller Hinton, con una densidad equivalente  $1 \times 10^8$  UFC/mL a los cuales se les realizó una dilución 1/100 ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) y, adicionalmente, se prepararon 10 tubos con 1.5mL de caldo Mueller Hinton para cada prueba.

Se preparó una solución stock del extracto vegetal a una concentración de 500mg/mL en DMSO al 10%, se agregó 1.5mL de la solución stock del extracto vegetal al tubo N°1, el cual correspondía a la concentración de 500mg/mL. Luego, partir del tubo N°2 que contenía 1.5mL de caldo Mueller Hinton, se agregó 1.5mL de la solución madre del extracto y se realizaron diluciones dobles seriadas hasta el tubo N°11, mezclando

las suspensiones con la ayuda de un vórtex y evaluando de esta manera concentraciones de 250mg/mL, 125mg/mL, 62.5mg/mL, 31,25mg/mL, 15.62mg/mL, 7.81mg/mL, 3.90mg/mL, 1.95mg/mL, 0.97mg/mL y 0.48mg/mL. Posteriormente, se adicionó a cada tubo, 1.5mL del inóculo preparado de cada cepa (aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC/mL). Los tubos fueron incubados a 37°C durante 24 horas. Finalmente, se calculó la CMI, considerándola como la concentración correspondiente al tubo con menor concentración del extracto donde no hubo desarrollo bacteriano, demostrado por la ausencia de turbidez, para ello se utilizó un control positivo y negativo de crecimiento (36, 37).

### *Concentración Mínima Bactericida (CMB)*

A partir de cada uno de los tubos sin desarrollo bacteriano visible, obtenidos en la prueba de CMI, fueron sembrados masivamente 0.1mL de las suspensiones sobre la superficie de placas de agar Mueller Hinton. Posteriormente, se incubaron a 37°C durante 24 horas y los ensayos se realizaron por triplicado. Para determinar la CMB se realizó el recuento de colonias en las placas, considerando la concentración mínima bactericida, como la menor concentración del extracto cuyo subcultivo inhibió totalmente el crecimiento de la bacteria (35).

### *Análisis estadístico*

Para el análisis estadístico se realizó una prueba t de Student para muestras indepen-

dientes, con el fin de comparar el porcentaje de inhibición obtenido con respecto a las dos técnicas empleadas para la determinación de la actividad antimicrobiana, las concentraciones del extracto y a las especies evaluadas. Los valores obtenidos fueron considerados estadísticamente significativos con un valor  $p < 0,05$ .

## Resultados

### Análisis fitoquímico preliminar

Mediante cromatografía en capa delgada (CCD), se evidenció la presencia de metabolitos de tipo cumarina en el extracto etanólico de *L. dulcis*, al observarse mancha azul (++) que fluoresce a la UV (365nm), (Eluente:  $\text{CHCl}_3$ : MeOH, 90:10, revelador químico borntträger, a 110°C). En esta placa también se observan manchas y zonas rojas en los extractos etanólicos de *P. alliacea* (++) , *L. dulcis* (+) y *L. cámara* (+), lo que sugiere la presencia de antraquinonas. Sin embargo, se requieren pruebas adicionales para confirmarlo, como la reacción de Borntträger-Kraus. Adicionalmente, en la prueba de flavonoides se observaron a la luz visible zonas coloreadas amarillas (+) en los extractos etanólicos de *P. alliacea* y *L. dulcis*, (revelador NP/PEG 4000, eluente:  $\text{CHCl}_3$ : MeOH, 90:10). Es necesario realizar pruebas de cromatografía y de coloración con extractos de mayor polaridad. Metabolitos de tipo terpenoide fueron detectados mediante vainillina/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  en etanol (luz visible, a 110°C), como manchas coloreadas,

especialmente, violetas, cafés y azules en todos los extractos. Manchas violetas fueron intensas (+++) en *P. alliacea*, mientras que manchas azules verdosas y azules fueron intensas (+++) en *L. dulcis* y *L. camara*, respectivamente. No se observó coloración en la prueba de alcaloides (-) en ninguno de los extractos. Sin embargo, se sugiere realizar de forma completa el análisis preliminar de alcaloides según Sanabria (27).

### Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

#### Difusión con discos y difusión en agar

El extracto etanólico de *L. dulcis* presentó actividad antimicrobiana sobre *P. vulgaris* ATCC 6380 mediante difusión con discos y en agar, en concentraciones de 1mg/mL y 2mg/mL. A una concentración de 2mg/mL mediante la técnica de difusión en agar, presentó porcentajes inhibitorios de 71.64% mientras que, a la misma concentración, utilizando discos, se establecieron efectos inhibitorios del 59.09%, como se puede observar en la Tabla 1. A concentración de 1mg/mL fue también activo frente a *P. vulgaris* con porcentajes de efecto inhibitorio superiores al 50% en las dos técnicas empleadas. De acuerdo con lo establecido por Ramírez y Díaz (38), la actividad antibacteriana de los extractos se considera alta cuando el porcentaje de inhibición relativo del crecimiento es >70%, intermedia entre el 50 y 70% y baja cuando es <50%; por lo tanto, es posible afirmar que el extracto de *L. dulcis* presentó alta e intermedia ac-

tividad antibacteriana respectivamente. Al evaluar los extractos obtenidos de *L. camara* y *P. alliacea*, no se evidenció actividad frente a *P. vulgaris*. Las pruebas anteriormente

citadas contaron con un disco impregnado con DMSO al 10% como control negativo, con el cual se evidenció crecimiento del microorganismo.

**Tabla 1.** Actividad antibacteriana de *Lippia dulcis* T. sobre *Proteus vulgaris* ATCC 6380 por difusión con discos y difusión en agar.

TÉCNICA			DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)											
			DIFUSIÓN CON DISCOS						DIFUSIÓN EN AGAR					
PLANTA			Réplicas del ensayo			Promedio	D.S.	Efecto inhibitorio %	Réplicas del ensayo			Promedio	D.S.	Efecto inhibitorio %
Lippia dulcis T.	Concentración mg/mL		1	2	3				1	2	3			
	1		11	11	12	11,66	0,57	52,23	14	13	13	13,33	0,57	55,55
	2		13	13	13	13	0	59,09	16	16	16	16	0	71,64
	1	Control positivo	23	22	22	22,33	0,57	N.A	24	24	24	24	0	N.A
	2	Control positivo	22	22	22	22	0	N.A	23	22	22	22,33	0,57	N.A

DS: Desviación estándar, Control positivo: Gentamicina 10µg, N.A: no aplica.

El extracto etanólico de *L. dulcis* presentó actividad frente a *S. aureus* en concentraciones de 1mg/mL y 2mg/mL. El mayor efecto inhibitorio (64.17%), se evidenció en la técnica de difusión en agar en concentraciones de 2mg/mL, con halos promedio de 14.33 mm de diámetro. A concentraciones de 1mg/mL y 2mg/mL, *L. camara* evidenció actividad frente a *S. aureus*, ob-

teniendo su mayor porcentaje de efecto inhibitorio (85.48%) a 2mg/mL, en la técnica de difusión con discos. A la concentración de 1mg/mL se evidenció actividad antibacteriana intermedia, con porcentajes de efecto inhibitorio correspondientes a 60.31% y 67.64% por difusión con disco y en agar, como se reporta en la Tabla 2.



**Tabla 2.** Actividad antibacteriana de *Lantana camara* L. y *Lippia dulcis* T. sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por difusión con discos y difusión en agar

TÉCNICA			DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)											
			DIFUSIÓN CON DISCOS						DIFUSIÓN EN AGAR					
PLANTA			Réplicas del ensayo			Promedio	D.S.	Efecto inhibitorio %	Réplicas del ensayo			Promedio	D.S.	Efecto inhibitorio %
	Concentración mg/mL		1	2	3				1	2	3			
Lantana camara L.	1		13	11	10	11,33	1,52	53,96	11	12	13	12	1	52,94
	2		14	11	11	12	1,73	58,06	14	14	15	14,33	0,57	64,17
Lippia dulcis T.	1		15	11	12	12,66	2,08	60,31	15	16	15	15,33	0,57	67,64
	2		17	18	18	17,66	0,57	85,48	18	17	17	17,33	0,57	77,61
	1	Control positivo	21	22	20	21	1	N.A	23	22	23	22,66	0,57	N.A
	2	Control positivo	20	22	20	20,66	1,15	N.A	22	22	23	22,33	0,57	N.A

DS: Desviación estándar, Control positivo: Gentamicina 10µg, N.A: no aplica.

Los extractos etanólicos evaluados a concentraciones de 1mg/mL y 2mg/mL no presentaron actividad antimicrobiana sobre *E. coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. En cuanto al extracto obtenido de *P. alliacea* (“anamú”), este no presentó actividad frente a ninguna de las bacterias en estudio.

Al comparar el porcentaje de inhibición frente a *S. aureus* con relación a los extractos etanólicos de las especies evaluadas (*L. camara* y *L. dulcis*) en la prueba t de Stu-

dent para muestras independientes se obtuvo un valor  $p=0.0318$ , determinando que existen diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de inhibición obtenidos para cada uno de los extractos. Por otra parte, al comparar los porcentajes de inhibición entre las dos técnicas empleadas (difusión con discos y difusión en agar) mediante la prueba t de Student se encontró un valor  $p = 0.4509$ , por lo que se puede establecer que no existe diferencia significativa en los resultados de las dos técnicas. De igual manera, al comparar los porcentajes

de inhibición obtenidos a las dos concentraciones (1mg/ml y 2mg/ml) no se encontró diferencia significativa ( $p = 0.067$ ).

### **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB)**

Se determinó la CMI y CMB de los extractos etanólicos obtenidos de *L. camara* y *L. dulcis*, que reportaron previamente actividad frente a algunas de las bacterias eva-

luadas (ver Tabla 3). La CMI del extracto etanólico de *L. camara* frente a *S. aureus*, correspondió a 7.81mg/ml, donde se observó la ausencia de turbidez visible. Se observó, además, la ausencia total de crecimiento en placa a una concentración mínima de 31.25mg/mL. En relación al extracto de *L. dulcis* frente a *S. aureus*, presentó una CMI de 1.95mg/mL. La concentración mínima bactericida de *S. aureus* correspondió a 7.81mg/ml y 250mg/ml para *P. vulgaris*.

**Tabla 3.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos vegetales activos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Proteus vulgaris* ATCC 6380.

EXTRACTO	Lippia dulcis T.				Lantana camara L.	
BACTERIA	Proteus vulgaris ATCC 6380		Staphylococcus aureus ATCC 25923		Staphylococcus aureus ATCC 25923	
Concentración del extracto (mg/mL)	Turbidez visible (CMI)	Crecimiento en placa (CMB)	Turbidez visible (CMI)	Crecimiento en placa (CMB)	Turbidez visible (CMI)	Crecimiento en placa (CMB)
500	-	-	-	-	-	-
250	-	-	-	-	-	-
125	-	+	-	-	-	-
62,5	-	+	-	-	-	-
31,25	-	+	-	-	-	-
15,62	+	+	-	-	-	+
7,81	+	+	-	-	-	+
3,90	+	+	-	+	+	+
1,95	+	+	-	+	+	+
0,97	+	+	+	+	+	+
0,48	+	+	+	+	+	+
(-): ausencia de turbidez (ausencia de crecimiento) (+): presencia de turbidez (crecimiento)						

## Discusión

La aparición de cepas resistentes a los antibióticos, elevada toxicidad, disminución del espectro de acción y los altos costos, hacen necesario el estudio de nuevos antimicrobianos de origen natural, que sean seguros, eficaces y accesibles para las comunidades (39, 40). En el presente trabajo, se evaluaron los extractos etanólicos obtenidos de tres especies vegetales frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, causantes de patologías infecciosas de importancia en salud pública.

La realización de pruebas de actividad antimicrobiana puede desarrollarse utilizando extractos vegetales obtenidos a partir de diferentes solventes de extracción como etanol, éter de petróleo, metanol, entre otros. En el presente ensayo se utilizaron extractos etanólicos debido a que pueden tener un mayor potencial antibacteriano frente a los aislamientos bacterianos en comparación con otros solventes como el éter de petróleo, gracias a su polaridad intermedia (41) y a su mayor variedad de metabolitos que le confieren esta propiedad (42).

De los tres extractos vegetales evaluados, *L. dulcis* presentó actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas (*P. vulgaris*) y Gram positivas (*S. aureus*) y *L. camara*, evidenció su actividad únicamente frente a bacterias Gram positivas (*S. aureus*). Como se reporta en estudios previos, puede haber mayor actividad por los extractos en bacterias Gram positivas, probablemente

por la diferencia en la permeabilidad a los componentes activos dada la diferencia en la estructura de las bacterias Gram positivas y Gram negativas (43). Se detectó actividad inhibitoria alta para el extracto de *L. dulcis* frente a *S. aureus* a una concentración de 2mg/mL (85,48%) mientras que los extractos de *L. camara* sobre *S. aureus* y de *L. dulcis* sobre *P. vulgaris* evidenciaron actividad inhibitoria intermedia, en concordancia con lo establecido por Ramírez y cols. (38). En relación a *L. dulcis*, en el extracto etanólico fue evidente la presencia de metabolitos tipo esteroide y/o terpenoide, (vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en etanol a 110°C), los cuales podrían estar relacionados con la actividad antibacteriana observada frente a *S. aureus* y *P. vulgaris*. Cáceres y cols. (44) también confirmaron la actividad del extracto etanólico de *L. dulcis* frente a bacterias enteropatógenas como *E. coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella flexneri*. Otros metabolitos detectados con una intensidad baja a intermedia en las pruebas de cromatografía fueron cumarinas (borntträger, UV 365nm a 110°C) y flavonoides (NP/PEG 4000); sin embargo, pruebas adicionales son requeridas para confirmarlo.

Mediante la técnica de difusión con discos, el extracto etanólico obtenido de *L. camara* presentó actividad inhibitoria frente a *S. aureus*, lo cual concuerda con lo reportado por Cruz y cols. (34), con un porcentaje de inhibición de 56.1%, similar a los obtenidos en este estudio, 53.96% y 56.06% a concentraciones de 1mg/mL y 2mg/mL, respectivamente. Adicionalmente, se repor-

ta la ausencia de actividad frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*, tal como lo encontrado en este estudio. En otras investigaciones, en las cuales se evaluaron extractos clorofórmicos de *L. camara* a diferentes concentraciones, se identificó actividad sobre *S. aureus* (45). La acción antimicrobiana de esta planta podría estar relacionada con su composición fitoquímica, constituida por sustancias con reconocida actividad antibacteriana como taninos, saponinas, flavonoides, terpenoides, antraquinonas, carotenos, alcaloides y fenoles (46, 47, 48). Metabolitos de tipo terpenoide y/o esteroide fueron evidentes en las pruebas de cromatografía en capa delgada realizadas (vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en etanol a 110°C), los cuales podrían favorecer la actividad antibacteriana frente a *S. aureus*.

Es posible que en la prueba de Bornträger se haya detectado el anillo de quinona de las furanonaftoquinonas presentes en *L. camara*; sin embargo, son necesarios estudios adicionales. Ghisalberti (49), en su revisión, indica que triterpenos pentacíclicos (como los derivados del ácido ursónico aislados de *L. camara*) y las furanonaftoquinonas han demostrado actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas como *S. aureus*. Aunque mediante cromatografía en capa delgada no fueron detectados metabolitos de tipo flavonoide en el extracto etanólico de *L. camara*, Naz y Bano (22) cuantificaron flavonoides totales en las hojas de esta especie por lo que estudios adicionales que empleen fracciones más polares podrían permitir su identificación. Adicionalmente, demostraron la actividad antibacteriana del

extracto metanólico de *L. camara* frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Es importante mencionar que el uso de etanol como disolvente orgánico, concentra mayor cantidad de compuestos afines por el agua como las saponinas y taninos. Estas sustancias presentan mecanismos de acción relacionados con la alteración de la tensión superficial de la membrana celular (50) y la inactivación de enzimas y proteínas de transporte celular (43) que pueden favorecer el efecto antibacteriano de estos compuestos.

El estudio realizado por Ochoa y cols. (51) reportó actividad antimicrobiana de extractos en solución hidroalcohólica y alcohol isopropílico provenientes de hojas de *P. alliacea* sobre *P. aeruginosa*. Sin embargo, el protocolo utilizado presenta variaciones respecto al utilizado en el presente estudio, como los solventes utilizados para la extracción, la cantidad de extracto adicionado a cada disco (10µL) y la utilización de un amplio rango de concentraciones. Adicionalmente, en el tamizaje fitoquímico de extractos hidroalcohólicos (etanol al 80%) de hojas frescas de *P. alliacea* con acción antimicrobiana frente a *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa*, se reportó la presencia de quinonas (++ por Bornträger), alcaloides (+++ por Dragendorff) y de otros metabolitos como flavonoides, fenoles y de esteroides/triterpenos con baja intensidad. En el presente estudio, los resultados de CCD sugirieron la presencia principalmente de metabolitos de tipo antraquinona, ter-

penoide y/o esteroide y flavonoides, estos últimos en baja intensidad; sin embargo, el extracto no demostró actividad antibacteriana. Los resultados obtenidos son coherentes con aquellos reportados por Sariego y cols., (17) quienes atribuyen la inactividad de extractos de *P. alliacea* a diferentes factores que podrían estar relacionados, como el material vegetal empleado (hojas que presenta bajas concentraciones de derivados sulfurados), la realización del secado del material, la temperatura de secado y el grado polaridad del extracto.

Los extractos etanólicos obtenidos a partir de *L. camara*, *L. dulcis* y *P. alliacea* no presentaron actividad sobre *E. coli* y *P. aeruginosa*. La falta de actividad de los extractos frente a estos microorganismos puede asociarse a su característica de poseer una membrana externa conformada por lipopolisacáridos, proteínas y fosfolípidos, que dificulta el acceso de los compuestos a la célula (52).

La prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es considerada el Gold standard para determinar la susceptibilidad de los organismos a los antimicrobianos. La determinación de la CMI por macrodilución en caldo demostró la actividad que presentan los extractos de *L. camara* y *L. dulcis* sobre *S. aureus*, a concentraciones bajas, correspondientes a 7.81mg/mL y 1.95mg/mL, respectivamente. La CMI más alta, fue 31.25mg/mL, obtenida para el extracto de *L. dulcis* frente a *P. vulgaris*. La sensibilidad de *S. aureus* frente a extractos etanólicos ob-

tenidos a partir de *L. cámara* fue reportada por Cruz y cols. (34), con una CMI de 12mg/mL por el método de macrodilución.

De acuerdo con Salada (53), la determinación de la relación CMI/CMB permite determinar el efecto que ejerce el agente antimicrobiano sobre los microorganismos evaluados. El autor menciona que cuando el valor de CMB no es más de cuatro veces más alto que el de CMI, indica que el compuesto es bactericida. Según los resultados obtenidos en el presente estudio, es posible considerar que los extractos de *L. camara* y *L. dulcis* presentan actividad bactericida frente a *S. aureus* y actividad bacteriostática sobre *P. vulgaris*.

Para el estudio antimicrobiano se realizaron curvas de crecimiento bacteriano como lo establecen Othman y cols. (32), con el fin de evidenciar la cinética de cada cepa y así determinar la fase exponencial, lo que permite establecer la concentración inicial; obteniendo así, resultados con mayor grado de confiabilidad.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan información sobre la promisoría actividad antibacteriana del extracto etanólico obtenido de *L. dulcis* frente a *S. aureus* y *P. vulgaris*; así mismo, sobre la potencial acción inhibitoria del extracto de *L. camara* sobre *S. aureus*. Con este estudio, se espera promover la investigación en plantas medicinales de uso tradicional, con el fin de identificar nuevas fuentes naturales de sustancias con efecto terapéutico que podrían

ser utilizadas para el tratamiento de enfermedades infecciosas de interés en salud pública y contribuir al estudio y uso sostenible de la biodiversidad colombiana (54-57).

Estudios bioguiados y de tamizaje fitoquímico son requeridos para confirmar los grupos de metabolitos responsables de la actividad antibacteriana de *L. dulcis* y *L. camara*. Adicionalmente, se recomienda realizar estudios con extractos hidroalcohólicos a partir de material fresco y seco (a bajas temperaturas de secado), obtenido de forma independiente tanto de hojas, como raíces y tallos de *P. alliacea* para confirmar su actividad antibacteriana y la detección de los metabolitos implicados.

### Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la Universidad Nacional Abierta y a Distancia, a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y a la Doctora Lina Espitia.

### Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran que no se incurrió en conflictos de intereses que hubieran podido afectar los resultados.

### Financiación

Proyecto de investigación “Estudio etnofarmacológico de plantas medicinales con po-

tencial actividad antimicrobiana y sobre el sistema nervioso central comercializadas en mercados populares de Bogotá, D.C.” (PG-2015-003, Convocatoria 005 de 2014, Sistema de Gestión de la Investigación, UNAD).

### Referencias

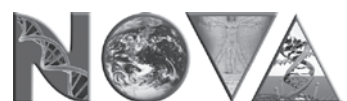
1. Dye C. After 2015: infectious diseases in a new era of health and development. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2014; 369(1645): 1-7
2. World Health Organization. Health statistics and information systems: Disease burden and mortality estimates, cause-specific mortality, 2000–2015. Summary tables of mortality estimates by cause, age and sex, globally and by region, 2000–2015. Global summary estimates [Internet] [Citado 20 de Enero de 2019] Disponible en [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates/en/index1.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html)
3. Alvo A, Téllez V, Sedano C, Fica A. Basic concepts for the rational use of antibiotics in otorhinolaryngology. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello.* 2016; 76(1): 136-147.
4. Lushniak BD. Antibiotic resistance: a public health crisis. *Public Health Rep.* 2014; 129(4):314–316.
5. Barrero L, Rivera S, Villalobos A. Consumo de Antibióticos en el ámbito hospitalario. Protocolo de vigilancia en salud pública. Colombia.2011 [Actualizado 29 Dic 2017; citado 01 Feb 2019]. Disponible en: [http://www.dadiscartagena.gov.co/images/docs/saludpublica/vigilancia/protocolos/p2018/pro\\_consumo\\_antibiotico\\_2018.pdf](http://www.dadiscartagena.gov.co/images/docs/saludpublica/vigilancia/protocolos/p2018/pro_consumo_antibiotico_2018.pdf)
6. Braz F, Monte L, Batista M, Vilar M, Milanez B. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: umareflexão no tratamento das infecções hospitalares. *Rev. Interdisciplinar.* 2011; 4(4): 72-77.



7. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002–2005. [Internet] Ginebra, Suiza. 2002 [citado 02 Feb 2019]. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67314/1/WHO\\_EDM\\_TRM\\_2002.1\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67314/1/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf)
8. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia Biodiversidad en cifras. [Internet]. Bogotá, Colombia. 2017. [citado 02 Feb 2019]. Disponible en: <http://www.sibcolombia.net/web/sib/cifras>
9. Bernal H, García H, Londoño C, Molano M, Quevedo G, Vásquez C. Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia. 1ra ed. [Internet] Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Ministerio de ambiente Vivienda y desarrollo Territorial. 2011 [citado 03 Feb 2019].
10. Ruiters AK, Tilney PM, Van Vuuren SF, Viljoen AM, Kamatou G, Van Wyk B. The anatomy, ethnobotany, antimicrobial activity and essential oil composition of southern African species of *Teucrium* (*Lamiaceae*). S. Afr. J. Bot. 2016; 102: 175–185.
11. Pinheiro M, Cruz L, Franco J, Bittencourt R, Steffenson V. Ethnobotany and antioxidant evaluation of commercialized medicinal plants from the Brazilian Pampa. Acta Botanica Brasilica. 2016; 30(1): 47–59.
12. Savithramma N, Yugandhar P, Devi PS, Ankanna S, Suhrulatha D, Prasad KS et al. Documentation of ethnomedicinal information and antimicrobial validation of *Thespesia populnea* used by Yanadi tribe of Ganugapenta village, Chittoor district, Andhra Pradesh, India. J Intercult Ethnopharmacol. 2017; 6(2): 158–167
13. Giraldo S, Bernal MC, Morales A, Pardo A, Gamba L. Descripción del uso tradicional de planta medicinales en mercados populares de Bogotá D.C. NOVA. 2015; 13 (23): 73–80.
14. Marx HE, O’Leary N, Yuan YW, Lu-Irving P, Tank DC, Múlgura ME, et al. A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. Am J Bot. 2010; 97(10): 1647–1663.
15. Patel NK, Yadav RK, Bharvad PB, Ahmed AA, Mohan JS. Screening of selected aromatic plants belonging to Labiateae and Verbenaceae family for their antimicrobial activity. Discovery Phytomedicine. 2018; 5(2): 14–25.
16. Luz DA, Pinheiro AM, Silva ML., Monteiro MC, Prediger RD, Maia C, et al. Ethnobotany, phytochemistry and neuropharmacological effects of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae): a review. J. ethnopharmacology. 2016; 185, 182–201.
17. Sariego S, Marin JE, Ochoa A, Viera Y. *Petiveria alliacea* L.: distintas condiciones experimentales en la elaboración de extractos con actividad antimicrobiana. Química Viva. 2013; 12(3). 274–287.
18. Mishra MP, Rath S, Swain SS, Ghosh G, Das D, Padhy RN. In vitro antibacterial activity of crude extracts of 9 selected medicinal plants against UTI causing MDR bacteria. J King Saud Univ Sci. 2017; 29(1): 84–95.
19. Marasini BP, Baral P, Aryal P, Ghimire KR, Neupane S, Dahal N, et al. Evaluation of Antibacterial Activity of Some Traditionally Used Medicinal Plants against Human Pathogenic Bacteria. Biomed Res Int. 2015; 2015: 1–5
20. Ulloa-Urizar G, Aguilar-Luis M, De Lama-Odría M, Camarena-Lizarzaburu J, Valle J. Antibacterial activity of five Peruvian medicinal plants against *Pseudomonas aeruginosa*. Asian Pac J Trop Biomed. 2015; 5(11): 928–931
21. Ochoa A, Marín J, González Z, Hidalgo A, Mujawimana R, Tamayo K et al. In vitro antimicrobial activity of total extracts of the leaves of *Petiveria alliacea* L. (Anamu). Braz. J. Pharm. Sci. 2013; 49 (2): 241–147.
22. Naz R, Bano A. Phytochemical screening, antioxidants and antimicrobial potential of *Lantana camara*

- in different solvents. Asian Pac J Trop Dis. 2013; 3(6): 480-486.
23. Regnier T, Plooy W, Combrinck S, Botha B. Fungitoxicity of *Lippia scaberrima* essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. Postharvest Biol. Technol. 2008; 48: 254–258.
  24. Giraldo S, Bernal MC, Morales A, Pardo A, Gamba L. Estudio etnobotánico de plantas medicinales comercializadas en mercados populares de Bogotá, D.C. XI Simposio Argentino, XIV Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica, I Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales, 2013, Dominguezia, [Resumen de memoria Ponencia] 29-30.
  25. Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2nd ed. Germany:Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York; 1996.
  26. CYTED. I curso taller iberoamericano sobre técnicas de separación e identificación de productos naturales polares organizado por las redes X.A “Red Iberoamericana de Productos Naturales de Uso Medicinal” La Laguna, Tenerife, España: 2000.
  27. Sanabria A. Análisis fitoquímico preliminar, metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 1983.
  28. Cappuccino J, Sherman N. Microbiology: a laboratory manual. 10th ed. United States of America: Pearson 10; 2014.
  29. Escobar L, Rojas C, Giraldo G, Padilla L. Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno. Rev. Invest. Univ. Quindío. 2010; (20): 42 - 49.
  30. Cockerill FR, Wikler MA, Alder J et al. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test – Approved Standard– Eleventh Edition. 11th ed. The United States of America: Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI; 2012: p11-12.
  31. Agrawal M, Varma A, Goyal S. Antibacterial screening of extract of the leaves of *Lantana camara*. Indian J. L.Sci. 2012; 1(2): 97-99.
  32. Othman M, Loh H, Wiart C, Khoo T, Lim K, Ting K. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. J Microbiol Methods. 2011; 84(2):161-166.
  33. Andrews J. BSAC standardized disc susceptibility testing method. J Antimicrob Chemother. 2001; 48 (1): 43-57.
  34. Cruz-Carrillo A, Rodríguez N, Rodríguez C. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. Rev. U.D.CA Act. & Div. Cient. 2010; 13(2): 117-124.
  35. Abadie RE, Medina R, Ruiz L, Tresierra-Ayala A. Actividad antibacteriana de extractos vegetales frente a cepas intrahospitalarias, Iquitos-Perú. Revista ECI Perú. 2014; 11 (1): 31-42
  36. Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Možina S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. J Microbiol Methods. 2010; 81(2):121-126.
  37. Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically Approved Standard—Ninth Edition [Internet]. 2012. CLSI. Disponible en:[http://shop.clsi.org/site/Sample\\_pdf/M07A10\\_sample.pdf](http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M07A10_sample.pdf)
  38. Ramírez LS, Díaz HE. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). Scientia et Technica. 2007; 1 (33): 397-400.
  39. Yılmaz Ç, Özcengiz G. Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. Biochem Pharmacol. 2017; 133: 43-62.
  40. Shriram V, Khare T, Bhagwat R, Shukla R, Kumar V. Inhibiting Bacterial Drug Efflux Pumps via Phyto-Therapeutics to Combat Threatening Antimicrobial Resistance. Front Microbiol. 2018 Dec; 9:1-12.
  41. Cowan M. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Rev. 1999; 12(4): 564–582.

42. Corrales Ramírez L, Castillo Castañeda A, Melo Vargas A. Evaluación del potencial antibacterial in vitro de *Croton lechleri* frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. NOVA. 2013; 11 (19): 51-61.
43. Dubey, M, Sharma S, Sengar R., Bhadauria, S, Gautam R.K. In Vitro antibacterial activity of *Lantana camara* leaves hydrosol. J Pharm Res. 2011; 4(11): 3972- 3974.
44. Cáceres A, Fletes L, Aguilar L, Ramirez O, Figueroa L, Taracena AM et al. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. Journal of Ethnopharmacology. 1993; 38(1), 31-38.
45. Lingamaneni K, Rao AL, Mishra US. Antibacterial and analgesic activity of leaves of *Lantana camara*. International Journal of Phytomedicine. 2011; 3(3): 381-385
46. Ajiboye AA, Oyedara OO, Agboola DA, Familola OT. Evaluation of Antibacterial Effects and Phytochemical Analysis of *Lantana camara* linn Leaf and Berry Extracts. European J Med Plants. 2014; 4(3): 332-341.
47. Inbaraj SD, Menezes G, Josephine G, Muniappan M, Muthiah NS. Antibacterial effect of *Lantana camara* Linn. On Gram negative bacteria and NDM-1 strain: an in vitro study. Asian J Pharm Clin Res, 2014; 7(2): 9-12.
48. Badasa S, Bufebo T. Phytochemical screening and antibacterial activities of solvent extract of *Lantana camara*. L leaf from Mekelle, Ethiopia. IJP. 2015; Vol. 2(2): 77-82.
49. Ghisalberti EL. *Lantana camara* L. (Verbenaceae). Fitoterapia. 2000; 71(5), 467-486.
50. Aliyu AB, Musa AM, Abdullahi MS, Ibrahim MA, Tijjani MB., Aliyu, MS. et.al. Activity of saponin fraction from *Anisopusmanni* against some pathogenic microorganisms. J. Med. Plants Res. 2011; 5(31): 6709- 6713.
51. Ochoa A, Marín J, Rivero D, Aguilera EM. Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana. Rev. Mex. Cienc. Farm. 2013; 44 (1): 52-59.
52. Exner M, Bhattacharya S, Christiansen B, Gebel J, Goroncy-Bermes P, Hartemann P et al. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? GMS Hyg Infect Control. 2017; 12: 2-24
53. Salada J, Balala L, Vásquez E. Phytochemical and Antibacterial Studies of *Lantana camara* L. leaf fraction and Essential oil. Inteenational Journal of Scientific and Research Publications. 2015; 5(3): 1-5.
54. Rodríguez Pava, C., Zarate Sanabria, A., & Sánchez Leal, L. (2017). Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. NOVA, 15(27), 119 - 129. <https://doi.org/10.22490/24629448.1963>
55. Rodríguez A, Óscar E., Roa A, V. P., & Palacios O, Édgar A. (2017). Actividad antibacteriana y antioxidante de *Baccharis revoluta* Kunth. NOVA, 14(25), 57-65. <https://doi.org/10.22490/24629448.1729>
56. Gutierrez, D., & Sánchez Mora, R. (2018). Tratamientos alternativos de medicina tradicional para *Chlamydia trachomatis*, agente causal de una infección asintomática. NOVA, 16(30), 65-74. <https://doi.org/10.22490/24629448.2836>
57. Chaparro Pedraza, A., & Campuzano, S. (2018). Aislamiento, identificación y evaluación de la actividad antimicrobiana de metabolitos producidos por *Mucor circinelloides* (Cepa Nativa SPG 321). NOVA, 16(29), 63-70. <https://doi.org/10.22490/24629448.2690>



**NOVA Publicación Científica  
en Ciencias Biomédicas**

# Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología

## Physicochemical Principles of dyes used In Microbiology

Lucía Constanza Corrales Ramírez <sup>1</sup>, Lilliana Caycedo Lozano <sup>2</sup>

### Resumen

La utilización de los colorantes en los procesos de identificación en microbiología se fundamenta en las propiedades físicoquímicas de estas sustancias. En el campo de la física, la óptica explica cómo todos los objetos son observables dependiendo de las longitudes de onda que se absorben y se transmiten dentro del denominado “espectro visible”. Dichas transiciones se deben, a su vez, a los compuestos químicos y a los movimientos electrónicos dentro de los átomos. Así mismo, cuando interacciona un colorante con una célula o un tejido, ocurren reacciones que dependen de grupos químicos funcionales denominados cromóforos y auxocromos.

Dependiendo de los compuestos químicos que los constituyen, los colorantes pueden ser ácidos, básicos o neutros y esta connotación se debe a la parte activa del colorante y a la reacción que ocasiona sobre las células microbianas.

De otra parte, las tinciones en microbiología pueden ser simples o diferenciales, dependiendo si toda la muestra se tiñe de uno o más colorantes. En el primer caso se encuentra el ejemplo de la coloración con azul de lactofenol y en el segundo, la coloración de Gram.

En el presente artículo se reseñan las principales coloraciones utilizadas en microbiología y se explican los fundamentos físicos y químicos de dichos procesos.

**Palabras claves:** colorante, espectro visible, grupos funcionales, microbiología.

---

1. Docente, Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio mayor de Cundinamarca  
Número de certificación CvLac 000048264120121119123  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2398-348X>

2. Docente, Programa de Ciencias Básicas. Universidad Colegio mayor de Cundinamarca  
Número de certificación CvLac 0000660221  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9274-3148>.

Correspondencia: lcorrales@unicolmayor.edu.co

## Abstract

The use of dyes in the identification processes in microbiology is based on the physicochemical properties of these substances. In the field of physics, optics explains how all objects are observable depending on the wavelengths that are absorbed and transmitted within the so-called “visible spectrum”. These transitions are, in turn, due to chemical compounds and the electronic movements within atoms. Likewise, when a dye interacts with a cell or tissue, reactions occur that depend on functional chemical groups called chromophores and auxochromes.

Depending on the chemical compounds that constitute them, the dyes can be acidic, basic or neutral and this connotation is due to the active part of the dye and the reaction it causes on the microbial cells.

On the other hand, stains in microbiology can be simple or differential, depending on whether the entire sample is stained with one or more dyes. In the first case is the example of the lactophenol blue staining and in the second, the Gram staining.

This article describes the main colorations used in microbiology and explains the physical and chemical foundations of these processes.

**Keywords:** Dye, Visible Spectrum, Functional Groups, Microbiology.

## Introducción

Las coloraciones o tinciones en microbiología se constituyen en el primer paso del proceso del análisis en el laboratorio para la identificación presuntiva de agentes infecciosos.

En el análisis microbiológico, el microscopio es la principal herramienta que se utiliza de forma rutinaria, por cuanto suministra información sobre la morfología, asociación y afinidad por la o las coloraciones para la

identificación presuntiva o definitiva de los microorganismos.

Desde hace más de un siglo, la microscopía ha ayudado a resolver problemas de etiología microbiana (1). Hay una gran variedad de tinciones que se han ido desarrollando para la detección de los diferentes agentes infecciosos como bacterias, parásitos y hongos. La tinción de Gram se considera básica en la valoración inicial de muestras



para análisis bacteriológico, mientras que tinciones como las de Wright son utilizadas para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con parásitos (2). Existen otras técnicas tintoriales específicas de gran utilidad, como la tinción de Ziehl-Neelsen, que se utiliza para el diagnóstico de bacilos ácido alcohol resistentes, o la tinción de azul de lactofenol, que conserva y tiñe los componentes estructurales de los hongos. En general, las diferentes tinciones que se utilizan en el laboratorio de microbiología, son técnicas sencillas, rápidas y que aportan información fundamental para el diagnóstico y procedimiento terapéutico oportuno de múltiples patologías de origen infeccioso (3).

Los colorantes son sustancias que tienen la capacidad de teñir células, estructuras o tejidos; y de acuerdo con su origen, permiten hacer visibles los objetos microscópicos y transparentes, conocer su forma y tamaño, así como sus estructuras internas y externas. Los colorantes hacen parte de reacciones químicas específicas y de acuerdo con su origen, se pueden clasificar en naturales, aquellos que son extraídos de plantas o animales, y artificiales, los que se extraen de minerales y son procesados en el laboratorio. En cuanto a su estructura química los colorantes están constituidos por un grupo funcional cromóforo y un auxócromo (4).

En un colorante, el cromóforo es un grupo funcional que cuenta con una alta densidad electrónica y por lo tanto se pueden clasificar de la siguiente manera:

- *Dobles y triples enlaces carbono-carbono*
- *Anillos aromáticos*
- *Grupos carbonilos, imino, diazo y nitro*
- *Estructuras que presenten enlaces entre el carbono y átomos con pares de electrones libres.*

Por su parte, los auxocromos, son sustituyentes del cromóforo y alteran los valores de las longitudes de onda en las que se presentan las absorciones de la luz. Generalmente, los auxocromos son grupos mucho más sencillos que los cromóforos, como es el caso de grupos metilo (-CH<sub>3</sub>), halógenos (-X), hidroxilos (-OH), y amino (-NH<sub>2</sub>).

Dependiendo de la sustitución en el cromóforo y el sustituyente o auxocromo, los efectos que se logran en la molécula del colorante se han clasificado de acuerdo al desplazamiento de la banda de absorción en el espectro.

Si el auxocromo causa una absorción del cromóforo hacia longitudes de onda mayores se denomina **batocrómico**.

Si el auxocromo causa una absorción del cromóforo hacia longitudes de onda menores se denomina **hipsocrómico** (5).

### **Fundamento físicoquímico de las coloraciones**

De acuerdo con lo anterior, un colorante es un compuesto orgánico que al aplicarlo a un sustrato (orgánico o inorgánico) le altera

la propiedad física del color atendiendo a la modificación en las zonas de absorción del espectro visible.

### • *Color y colorantes*

De acuerdo con Flores y cols.: “...la búsqueda de la esencia del color se pierde en la antigüedad...” (6). La anterior afirmación se centra en que a través de los tiempos, desde físicos hasta sicólogos, pasando por químicos y artistas, han definido el color desde sus propios intereses y lo han ligado a su campo de desempeño. Todos hemos tratado de brindar una definición a un fenómeno físico/químico tan etéreo, pero a la vez tan perceptible que se conoce como “color” y que nos permite aproximarnos y hacer visible aquello que no nos es conocido.

En términos fisicoquímicos se puede definir el color a partir de las transiciones elec-

trónicas que ocurren al interior de los átomos y que permiten simultáneamente dos fenómenos (la absorción y la emisión) de radiación en el espectro denominado visible (400nm a 700nm) que es perceptible por el ojo humano (6).

Así, las transiciones electrónicas de los átomos que constituyen una sustancia, permitirán la observación (color) de las ondas que no son absorbidas de toda la gama del espectro visible de energía por parte de los electrones.

La anterior definición para el color está asociada a una “sustancia” que absorbe y emite energía en el intervalo del espectro visible (400nm a 700 nm) y los colores corresponden al único rango que no se absorbe y que es visible al ojo (4).

**Tabla 1.** Rangos de longitudes de onda para los diferentes colores.

Rango de longitud de onda absorbida (nm)	Rango de longitud de onda emitido (nm)	Color percibido	Apreciación del color
~470-500	~700-620	Rojo	
~430-470	~620-592	Naranja	
~400-430	~592-578	Amarillo	
~610-700	~578-500	Verde	
~590-610	~500-450	Azul	
~570-590	~450-400	Violeta	

Si las transiciones electrónicas ocurren en intervalos por debajo de 400nm corresponden a absorciones que se “observan” en el espectro infrarrojo, y no serán detectadas por el ojo como colores; así mismo, si las transiciones ocurren por encima de 700nm corresponden a absorciones que se “observan” en el espectro ultravioleta y tampoco serán detectadas por el ojo como colores.

La óptica ha permitido establecer que los objetos son visibles dependiendo de la luz que sobre ellos incida y de acuerdo a lo anterior el color que tome dicho objeto depende de la radiación que el mismo emita (7).

En este sentido, si el objeto es verde toda la luz que incide sobre él se descompone y transmite al ojo solo la longitud correspondiente al rango entre 500 y 578 nm, el resto lo absorbe gracias a las transiciones electrónicas que ocurren en los niveles de energía de los átomos que lo componen.

Como se mencionó anteriormente, los responsables de los colores en los compuestos son los cromóforos y sus colores se intensifican o modifican por la presencia de los auxocromos.

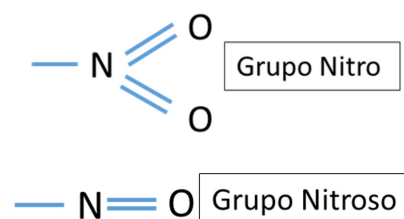
La alta densidad electrónica presente en algunos grupos funcionales explica por qué son considerados cromóforos por excelencia (5).

**Figura 1.** Grupo Azo.



En el grupo AZO, cada átomo de nitrógeno posee 5 electrones de valencia de los cuales comparte 2 con el otro átomo de nitrógeno y uno queda disponible para enlazarse bien sea con un radical aromático o alifático. Esto quiere decir que el grupo funcional cuenta con alta densidad electrónica aportada por pares de electrones libres que no intervienen en los enlaces; y además, existen electrones en orbitales “p” que constituyen enlaces “pi” entre los dos átomos. Lo anterior facilita la movilidad de los electrones y las absorciones de energía que, como ya se estableció ocasionan el color (8). La presencia o no de este grupo ha permitido clasificar los colorantes en azoicos y no azoicos.

**Figura 2.** Grupo Nitro y grupo nitroso.



De otro lado, en los grupos NITRO y NITROSO, la configuración electrónica del nitrógeno en los grupos es:  $1s^2 2s^2 2p^3$ , y la configuración del oxígeno en éstos mismos grupos es:  $1s^2 2s^2 2p^4$ .

En las asociaciones moleculares, entre el átomo de nitrógeno y el de oxígeno se conjugan altas densidades electrónicas de estos elementos electronegativos. Con el fin de alcanzar la estabilidad química, puede ocurrir que se presenten enlaces con uno o dos

átomos de oxígeno en los que intervienen electrones procedentes de orbitales “p”.

Una situación similar ocurre en los grupos funcionales “TIO” en los que se presentan enlaces covalentes entre el átomo de azufre y el de carbono e igualmente la densidad electrónica es muy alta alrededor de los núcleos de los átomos mencionados, presentando cada uno de los átomos las siguientes distribuciones electrónicas: carbono:  $1s^2 2s^2 2p^2$  y azufre:  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^4$ .

Figura 3. Grupo Tio.



Un factor que aumenta la concentración de electrones en estos cromóforos está relacionado con que usualmente se encuentran asociados a anillos aromáticos que aportan electrones a las nubes electrónicas; y por ende, a las transiciones en los niveles atómicos, ocasionando alteraciones en el espectro visible, que como ya se anotó, originan el fenómeno del color.

Por su parte, las estructuras de los auxocromos corresponden a grupos menos complejos y con menores densidades electrónicas.

Tal es el caso de los grupos hidroxilo ( $-OH$ ); metoxi ( $-OCH_3$ ); amino ( $-NH_2$ ) y los halógenos ( $Cl$ ,  $I$ ,  $Br$ ).

En general, cuanto mayor sea el número de dobles ligaduras conjugadas en un grupo

funcional, mejor se comportará como cromóforo debido a que las transiciones electrónicas se facilitan en atención a la diferencia entre los niveles de energía. Así mismo, entre mayor número de enlaces conjugados haya en la molécula mayor es el rango de longitud de onda absorbida y mayor también la intensidad del color (9).

Siguiendo lo planteado por Magdalena “... un colorante es un tinte extraído de plantas o animales (de origen natural) o de minerales procesados en un laboratorio; mientras que un pigmento es una sustancia natural o artificial, que no es soluble en agua ni en aceite, que se usa para colorear, opacar o transparentar el color de un objeto” (10).

Teniendo en cuenta las estructuras químicas generales de los colorantes y la densidad electrónica que en ellos se presenta, la propiedad de teñir depende principalmente del carácter ácido o básico del grupo funcional (cromóforo) (11).

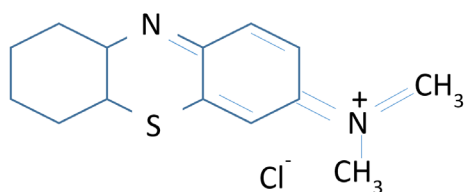
De acuerdo con lo anterior, la clasificación según la acidez de los colorantes es de especial importancia en el trabajo con dichos compuestos en el campo de la microbiología.

**Colorantes neutros:** se obtienen a partir de los precipitados provenientes de soluciones acuosas en las que se encuentran disueltos cromóforos con características ácidas y básicas (8, 10). El colorante se produce disolviendo el precipitado en alcohol, tal es el caso de la **Giemsa**.

En la tinción de Giemsa, se combinan el carácter básico de los colorantes azul de metileno, Azure A y Azure B y el carácter ácido de la eosina, lo que ofrece un espectro amplio de colores dependiendo de los ajustes de pH.

**Colorantes básicos:** la acción colorante está a cargo del catión, mientras que el anión no tiene esa propiedad. Un ejemplo es el **azul de metileno** (cloruro de metiltionina). El grupo amino (básico) es el grupo funcional activo en la molécula (12).

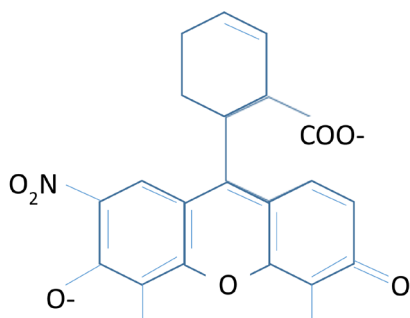
Figura 4. Cloruro de Metionina.



Cloruro de metionina

**Colorantes ácidos:** la sustancia colorante está a cargo del anión, mientras que el catión no tiene esa propiedad. Un ejemplo es la Eosina o **Eosinato de sodio**. El grupo carboxilo (ácido) es el grupo funcional activo en la molécula (12).

Figura 5. Eosinato.



Eosinato

Al momento de la coloración, ocurre una combinación de procesos físicos y reacciones químicas: la solubilidad y las interacciones moleculares son claves para explicar el fenómeno de tinción (12).

#### • *Procesos Físicos*

Al contacto con el colorante ocurre un fenómeno de absorción, similar al que tiene lugar en las materias porosas, dicho compuesto penetra al interior del sustrato aprovechando los espacios intersticiales y la cohesión molecular, sin que ocurra enlace químico. Es un proceso que se explica similar a la solubilidad de una sustancia en otra (11).

#### • *Reacción Química*

Las células microbianas contienen compuestos entre los cuales se encuentran los **ácidos nucleicos**. Debido a la presencia de los grupos fosfato en dichos ácidos, se concentran en las moléculas cargas negativas, las cuales facilitan combinaciones con los colorantes de tipo básico catiónicos (13, 14).

De otra parte, los colorantes ácidos, aniónicos, no tiñen la célula y por esto, se emplean como colorantes de contraste, como, por ejemplo: el azul de metileno o la eosina que no colorean al microorganismo, pero sí el fondo del campo microscópico (14).

Las coloraciones pueden ser simples cuando toda la muestra se tiñe del mismo color y se utiliza un sólo colorante: es el caso de

azul de metileno de Loeffler o tinta china. De otra parte, la coloración diferencial ocurre cuando se visualiza más de un color porque se utiliza un colorante primario y otro de contraste. En algunos casos también se emplean mordientes y sustancias decolorantes, como en la coloración de Gram o Ziehl-Neelsen; o en coloraciones cuando se utilizan anticuerpos marcados con una molécula fluorescente para identificar estructuras celulares específicas, denominadas coloraciones inmunocitoquímicas (12, 15).

Algunas preparaciones biológicas requieren antes de su proceso de coloración, la fijación de las muestras, con el propósito de preservar la geometría estructural y química de las células que se desean visualizar, y esta fijación se puede realizar por métodos físicos o químicos.

Entre los procesos de fijación físicos se encuentran la desecación, calor seco, calor húmedo, ultrasonido y microondas; y en los de fijación químicos se encuentran procesos de oxidación en los que se utilizan compuestos que tienen la propiedad de comportarse como oxidantes, tales como el óxido crómico ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ), ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), ácido pícrico ( $\text{C}_6\text{H}_2\text{OH}(\text{NO}_2)_3$ ), acetona ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) y reductores como aldehídos y alcoholes entre los que se encuentran: el formaldehído ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), glutaraldehído ( $\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$ ), etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) y paraldehído ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3$ ) (15).

El método de fijación más utilizado en microbiología es el físico, por medio del calor seco, que consiste en exponer directamente la lámina con la preparación a la llama del mechero. Este procedimiento detiene los procesos vitales de los microorganismos sin alterar sus estructuras. Parece sencillo, pero hay que tener en cuenta que la sobreexposición al calor, o la exposición en una zona incorrecta de la llama (zona fría, zona caliente y zona de fusión) incide en el efecto deseado; así, es muy común provocar alteraciones morfológicas y destrucción celular. El tiempo de preservación del extendido por este método es corto. De otro lado, los métodos químicos ofrecen mejores resultados para la fijación, ya que son líquidos-solventes con potencial alto de difusión intracelular y detienen procesos enzimáticos que provocan autólisis. Estos fijadores tienen la capacidad de interactuar con biomoléculas como proteínas, glicoproteínas, péptidoglicanos, lípidos, glicolípidos, lipoproteínas, pigmentos, ácidos pépticos y nucleicos; además preservan la arquitectura de la pared celular y evitan la sobrecoloración (15).

Dentro del proceso diagnóstico microbiológico que incluye coloraciones, se debe incluir el control de calidad, mediante la realización de la tinción de un agente infeccioso ya identificado, el cual será el control positivo.



## Examen microscópico de muestras clínicas sin tinción

Es el montaje directo húmedo o examen en fresco, en el cual las muestras se extienden directamente sobre la superficie de un portaobjetos para su observación. El material que es demasiado espeso para permitir la

diferenciación de sus elementos puede diluirse con igual volumen de solución salina y a continuación se deposita un cubreobjetos sobre la superficie del material.

**Fotografía 1.** Nemátodo en solución salina. /L. Corrales.



Este tipo de preparación se emplea para detectar trofozoítos móviles de parásitos intestinales como *Giardia*, *Entamoeba*, huevos y quistes de otros parásitos, larvas y gusanos adultos, *Trichomonas*, hifas de hongos o vaginosis causada por *Gardnerella vaginalis* (16).

## Examen microscópico de las muestras clínicas con tinciones

Como se mencionó anteriormente, los colorantes pueden ser **básicos** o **ácidos**, depen-

diendo de si la carga es positiva o negativa; entre los primeros se encuentran el azul de metileno, cristal violeta y safranina, mientras que en el segundo grupo se encuentra además de la eosina, la nigrosina.

Por su parte, los colorantes **liposolubles** se mezclan con los lípidos celulares y los tiñen, este es el caso del Negro Sudán (17).

Los ácidos y las bases libres son, en general, poco solubles, por lo que en microbiología se utilizan casi exclusivamente las sales de los ácidos y de las bases colorantes. Los lla-

mados colorantes básicos contienen un catión coloreado unido a un anión incoloro y los ácidos constan de un catión incoloro unido a un anión coloreado.

Los básicos son los más usados en bacteriología, debido a que las bacterias, ricas en ácidos nucleicos, portan cargas negativas en forma de grupos fosfato, los que se combinan con los colorantes cargados positivamente. Dentro de éstos los más empleados son: tionina, azul de toluidina, azul de metileno, fucsina, cristal violeta, violeta de genciana, verde metilo, safranina y verde de malaquita; y entre los ácidos se encuentran naranja G, ácido pícrico, fucsina ácida y eosina.

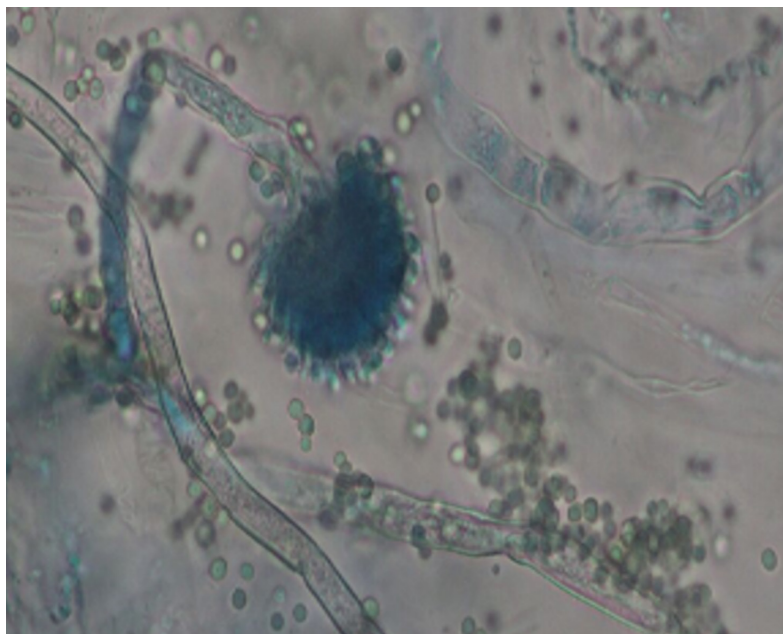
Los colorantes ácidos se utilizan en técnicas especiales, coloraciones negativas o para teñir algunas estructuras bacterianas, fun-

damentalmente citoplasmáticas. Existe un grupo de sustancias, cuya base y ácido tienen carácter colorante, y son denominadas colorantes neutros. Entre ellos se encuentran los eosinatos como el de azul de metileno, azul de toluidina y violeta de metilo (18).

### *Tinción simple*

En estas se utiliza un solo colorante, por lo que todas las estructuras celulares se tiñen con la misma tonalidad (tinta china, azul metileno de Loeffler, azul de lactofenol). Se basa en el hecho de que las células tienen una composición química diferente a la de su entorno, de modo que ambos se comportan de forma diferente frente al colorante (19, 20, 21).

**Fotografía 2.** Estructura micótica coloreada con azul de lactofenol. /L. Corrales.



### *Tinción diferencial o compuesta*

En estas se utilizan varios colorantes combinados, las estructuras celulares se diferencian en función de los colorantes que fijan. Se basan en el hecho de que distintos tipos de células tienen distinta composición química; y por lo tanto, reaccionan de forma diferente frente a una tinción, lo que permite clasificar los microorganismos en diferentes grupos. Los ejemplos clásicos serían la tinción de Gram o la de Ziehl-Neelsen (19, 20).

### *Tinción selectiva*

Se basan en el hecho de que existen estructuras celulares con una composición química determinada afín por uno de los colorantes que se aplican en la tinción, de modo que se tiñen selectivamente como las esporas, los flagelos y los gránulos metacromáticos, entre otros (19, 20).

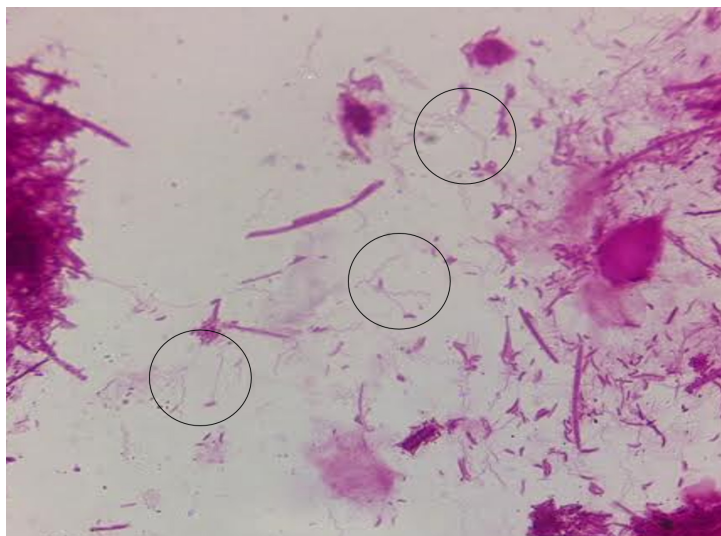
### *Coloraciones más frecuentes en microbiología*

#### *Coloración de Echio Riv*

Es una técnica de coloración simple que permite observar la morfología bacteriana, sea esta respectivamente de cocos, bacilos, espirilos o espiroquetas. Todas las estructuras se tiñen de la misma tonalidad. Para esta coloración se usa la fucsina y el bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ). Es una coloración simple, por lo que las células se teñirán de un mismo color.

La bacteria tiene una carga negativa conferida por el citoplasma y los ácidos nucleicos, mientras que la fucsina tiene una carga básica (catiónica); por lo tanto, por atracción electrostática se atraen; y el bicarbonato ayuda en la estabilización de cargas (20, 22).

**Fotografía 3.** Espiroquetas coloreadas por la técnica de Echio Riv./ L.Corrales.

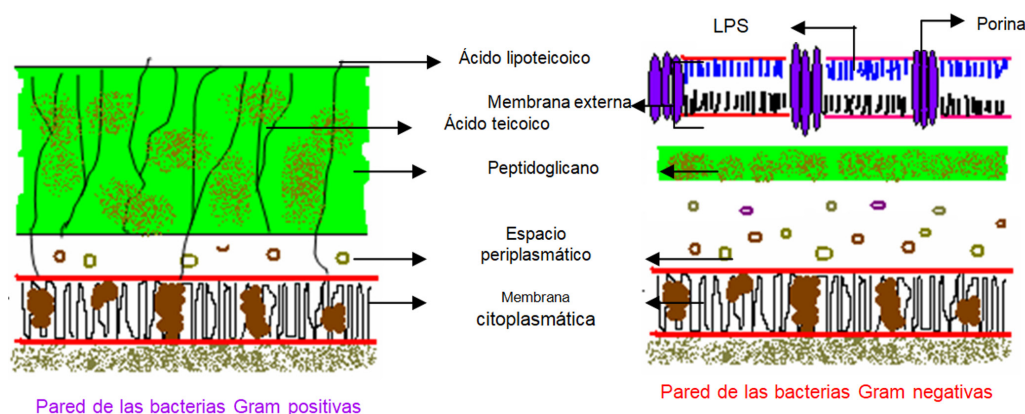


## Tinción de Gram

En bacteriología la tinción de Gram es una herramienta fundamental para diferenciar distintos tipos de bacterias según su coloración, morfología y asociación (23). En 1884, el Doctor Chistian Gram desarrolló esta técnica y de acuerdo a los componentes

estructurales que presentan las bacterias se pueden clasificar en Gram positivas y Gram negativas, de acuerdo con la composición de su pared (24). La pared bacteriana, corresponde a la estructura que da forma a la célula y la protege de lisis osmótica, acción de sustancias tóxicas y es el lugar sobre el cual actúan varios antibióticos (25, 26).

**Figura 6.** Estructura de la pared bacteriana de Gram positivas y Gram negativas / L. C. Corrales., A. P. González.



Los principios de la tinción de Gram están basados en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo. La pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de péptidoglicano y una membrana celular externa, mientras que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida por péptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa. Así pues, la composición química y el contenido de péptidoglicano en la pared celular de las bacterias Gram negativas y

Gram positivas explica y determina las características tintoriales (16, 26).

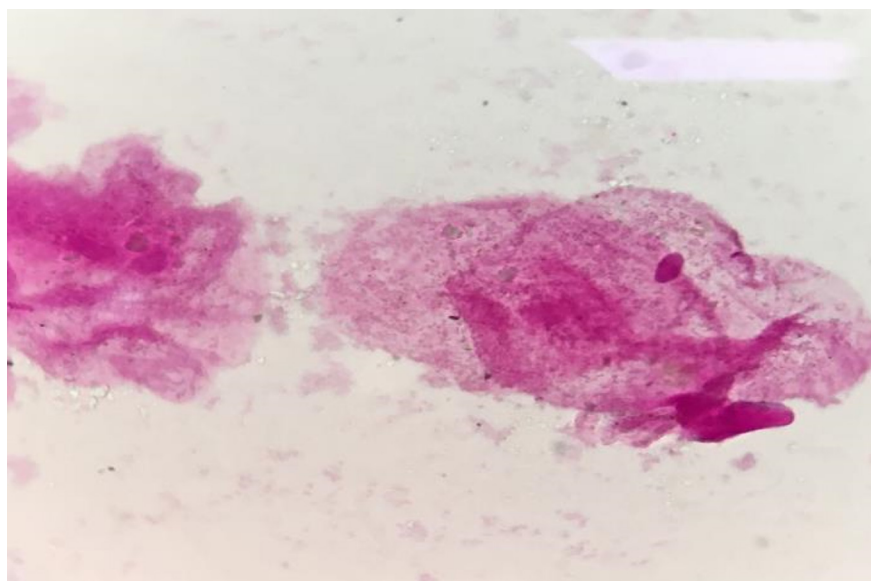
Esta tinción se basa en colocar como colorante primario cristal violeta, el cual tiene afinidad por el péptidoglicano de la pared bacteriana. Posteriormente, se coloca lugol, el cual sirve como mordiente e impide la salida del cristal violeta por la formación de un complejo cristal violeta-yodo que satura los espacios del péptidoglicano de la pared bacteriana. Posteriormente, se aplica una mezcla de alcohol-acetona, la cual deshidrata la pared bacteriana y cierra los

poros de la misma. También destruye la membrana externa de las bacterias Gram negativas, debido a que esta es soluble a la acción de solventes orgánicos, como la mezcla de alcohol-acetona. Las bacterias Gram positivas, al contener una gran cantidad de péptidoglicano, retienen con mayor fuerza este complejo, mientras que las Gram negativas no lo pueden retener por poseer menos cantidad de péptidoglicano. Por último, se coloca fucsina, la cual actúa como coloran-

te secundario o de contratinción y tiñe las bacterias que no logran retener el complejo cristal violeta-yodo.

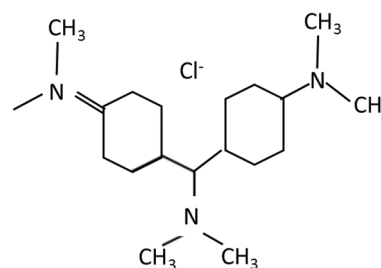
Hay bacterias de un mismo género que pueden observarse en la misma muestra como Gram positivas y como Gram negativas, a esto se le denomina tinción Gram variable, secundaria a alteración en nutrientes, estructuras, temperatura, pH o concentración de electrolitos en la célula.

**Fotografía 4.** Tinción de Gram de muestra de secreción vaginal. Se observan células guía en vaginosis bacteriana, con flora bacteriana Gram variable. / L. Corrales.



No todas las bacterias se tiñen por esta técnica, pues hay algunas que carecen de pared celular, como mycoplasmas (27) o su pared celular tiene una composición química diferente como las micobacterias, que cuentan con una gran cantidad de ácidos micólicos y requieren otro tipo de coloraciones específicas (22, 28).

**Figura 7.** Estructura molecular de cristal violeta.





El cristal violeta corresponde al nombre común asignado a un tipo de colorantes en los que se encuentra una mezcla de N-tetra, N-penta y N-hexametil p-rosanilinas. Específicamente, el reactivo usado para la prueba de Gram corresponde al derivado que tiene 6 sustituciones metílicas. Precisamente, debido a la alta sustitución de grupos metilo, éste compuesto es el que brinda una tonalidad violeta más oscura y se conoce como violeta 10B. Los grupos metilo son los que se constituyen en los auxocromos responsables, en buena parte, de la formación del enlace complejo que da origen a la tinción (8, 9).

### Reactivo de Lugol

Lo primero que hay que aclarar con respecto al reactivo de Lugol es que no corresponde a una sustancia pura; es decir, no es un compuesto con una fórmula química específica, sino que su acción se debe precisamente a la mezcla en forma homogénea y en solución acuosa de Yoduro de Potasio (KI) y Yodo (I<sub>2</sub>).

Así la solución de lugol está compuesta por una mezcla saturada de Yodo, que deja disponible a este elemento para que reaccione en forma de iones.



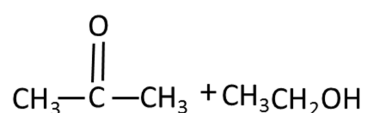
El reactivo denominado ‘Lugol’, fue utilizado por primera vez por el Dr. Jean Guillaume Auguste Lugol (1786–1851) (29), quien utilizó esta solución para tratar la esrófula

(conocida comúnmente como la enfermedad de las paperas). El proceso infeccioso es causado por el *Mycobacterium tuberculosis*. El doctor en mención realizó publicaciones en las que resaltaba el tratamiento para dicha enfermedad utilizando una solución en la que se mezclaban Yodo (I) con Yoduro de Potasio (KI). Posteriormente, y con base en estas investigaciones, se implementó el uso del elemento yodo en el tratamiento de la enfermedad del bocio (30).

### Alcohol–Acetona

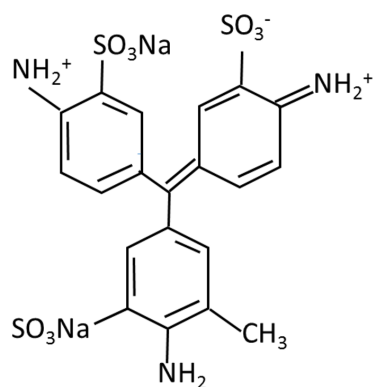
Estos dos compuestos actúan en forma de solución y dan origen a un reactivo que, al igual que el lugol, no corresponde a una sustancia pura. La solución alcohol-acetona, tiene propiedades deshidratantes que permiten en primera instancia la captura de las moléculas de agua de la membrana, debido a interacciones moleculares que se explican por la formación de dipolos entre las moléculas. De esta manera, se entiende el efecto decolorante en las paredes de las bacterias gramnegativas, teniendo en cuenta que el alcohol-acetona desorganiza dichas membranas constituidas principalmente por lipoproteínas y lipopolisacáridos lo que permite la salida del colorante primario (cristal violeta).

Figura 8. Mezcla de propanona y etanol.





**Figura 9.** Estructura Molecular de la Fuscina Básica.

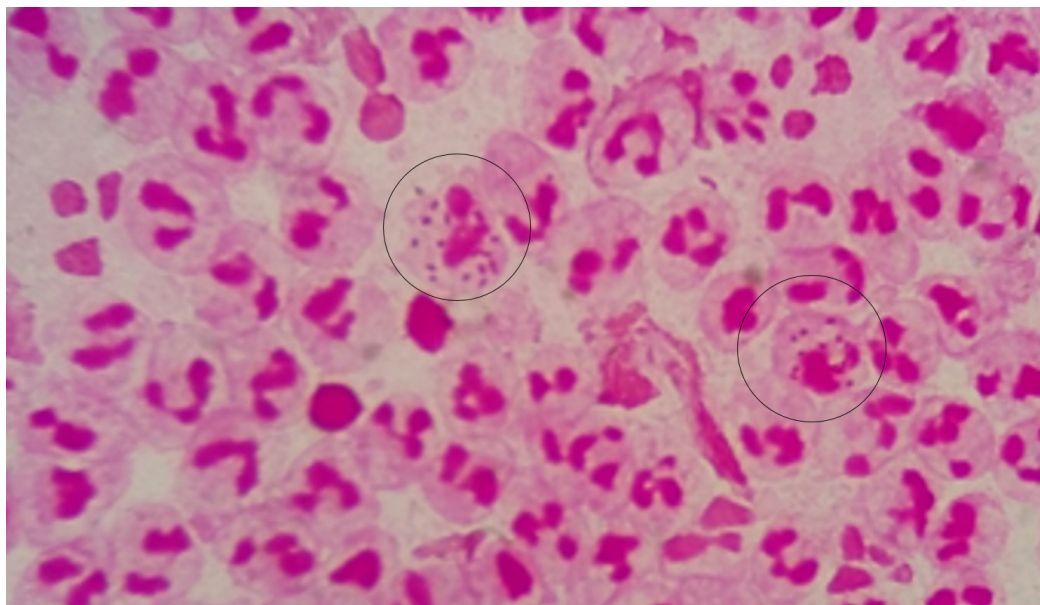


La fuscina básica, como colorante de contraste, corresponde al reactivo denominado Violeta Ácido 19, que a su vez es identificado por la fórmula química condensada de:  $C_{20}N_3H_{17}O_9S_3Na_2$ . La función específica de

contraste se explica por la presencia tanto de los anillos como del grupo  $NH_2$  y su función es hacer visibles a las bacterias Gram negativas debido a la formación de un complejo coloreado “rojo” (31).

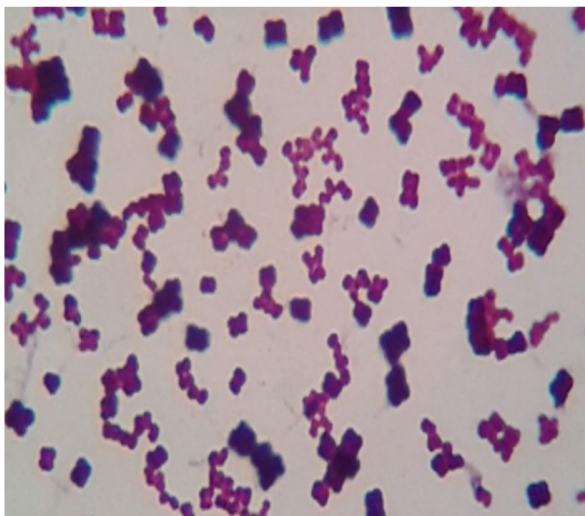
La pared celular de las bacterias Gram positivas logra la retención del primer colorante, debido al espesor aproximado de 80nm del entramado de varias capas de péptido-glicano, por lo cual, no toma la fuscina.

**Fotografía 5.** Tinción de Gram de una muestra directa de secreción uretral, se observan los Polimorfonucleares Neutrófilos y diplococos Gram negativos intracelulares. /L. Corrales.

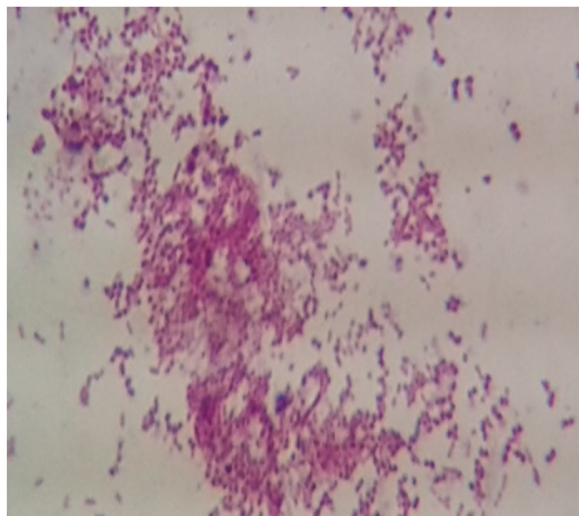


El reporte se realiza de acuerdo a la morfología, asociación y color observado.

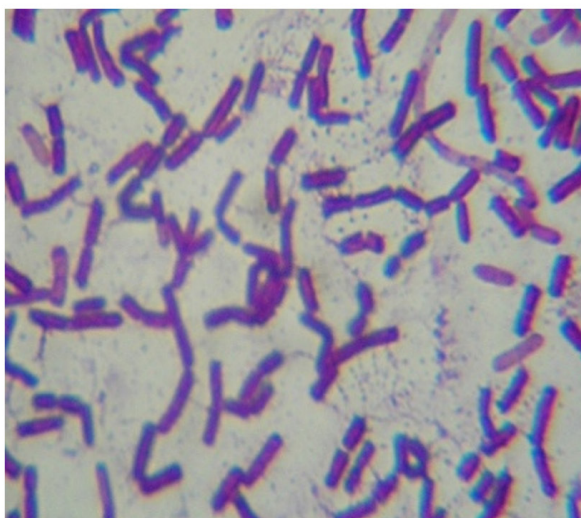
**Fotografía 6.** Flora mixta al Gram / L. Corrales.



**Fotografía 7.** Diplococos Gram negativos/L. Corrales.



**Fotografía 8.** Bacilos Gram positivos/L. Corrales.



Para el reporte del informe, es importante, tener en cuenta:

*Forma:* cocos (esféricos), bacilos (bastones, cilindros), cocobacilos (bastones cortos, ovoidales), vibrios (bacilo en forma de

coma), espirilos (bacilos en forma de tirabuzón).

*Agrupamiento:* aislado (individual), diplos, parejas, tetradas, cadenas, racimos, empalizadas.

### *Tinción negativa o Burry*

Este tipo de tinción fue diseñada para microscopía de luz con el fin de rodear y delinear las bacterias no teñidas. Este método es muy útil, de bajo costo y valioso por la información que provee sobre las bacterias que pueden presentar cápsula, ya que proporciona un resultado presuntivo (32). La cápsula está compuesta por una capa adicional de polisacáridos, los cuales se encuen-

tran fuertemente unidos a la pared celular y ofrecen permeabilidad a la misma (33, 34).

El fundamento es simple: se tiñe el exterior, pero no el interior de células; es decir, no se colorean sus estructuras. Adicionalmente, sólo requiere tinta china como colorante: las partículas de carbono de la tinta no logran penetrar la cápsula, la cual se ve clara sobre el fondo oscuro que provee la tinta china.

**Fotografía 9.** Bacterias capsuladas con tinción de tinta china / L. Corrales.



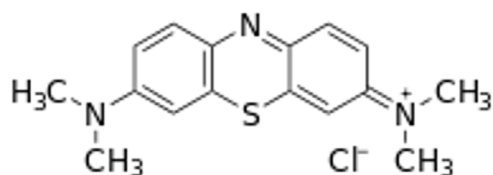
La tinta china da lugar a una suspensión coloidal de carbón, denominada “nigrosina”, que corresponde a un colorante ácido. Dichas partículas de carbono no irrumpen en el interior de las bacterias, pero sí colorean el entorno debido a una atracción intermolecular del tipo fuerzas de London (35).

El tamaño de las partículas del colorante, por tener características coloidales, incide en el proceso de tinción del medio ya

que dicho proceso no sería posible con una solución líquido-sólido convencional, por efectos de la miscibilidad (36).

### *Coloración de azul de metileno de Loeffler*

El azul de metileno se reconoce como un colorante sencillo que puede ser utilizado para fines diversos, tales como la determinación de la morfología bacteriana.

**Figura 10.** Estructura Molecular del azul de metileno.

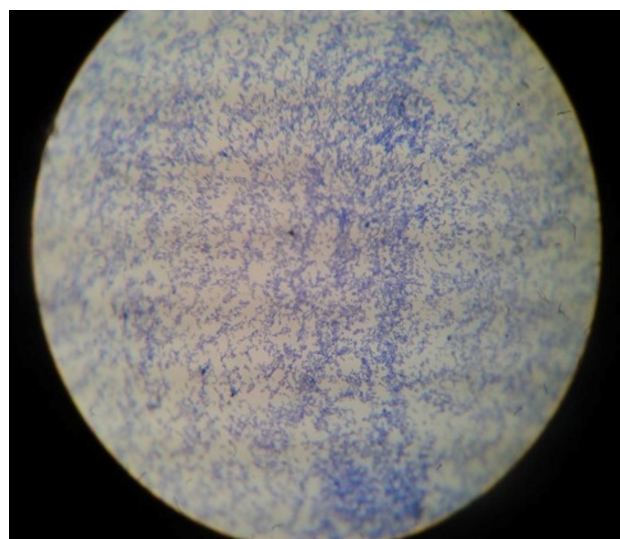
El nitrógeno cargado positivamente (catión) se constituye en el centro activo de la molécula; y por tanto, desde allí se explican las tinciones electrofílicas a partir de este compuesto, y la atracción hacia aniones tales como los grupos fosfato  $(\text{PO}_4)^{-3}$  (31).

En este sentido, es el colorante preferido para la identificación presuntiva de *Corynebacterium diphtheriae*, aunque también se utiliza para la identificación de espirilos y bacilos lácticos. Este microorganismo presenta dilataciones regulares características de uno de sus polos, lo cual le da una apariencia de maso. Dichas inclusiones corresponden a gránulos que contienen ácido polifosfórico, el cual es un polímero inorgánico del ácido fosfórico  $(\text{HO}(\text{PO}_2\text{OH})_n\text{H})$ . La asociación en dichos gránulos da lugar a un efecto metacromático que a su vez produce una tinción más intensa con los colorantes de anilina, como es el caso del azul de metileno alcalino de Loeffler. Para el resto del bacilo, la tinción es menos marcada con un azul más claro, obteniendo como resultado de la tinción, una apariencia de rosario al teñirse.

La parte interna de los cúmulos está constituida por un núcleo formado por moléculas apolares de lípidos y proteínas; mientras

que, en la periferia, como se anotó anteriormente, se encuentran los polímeros de polifosfato, dando lugar a un mecanismo osmóticamente inerte de almacenamiento de grupos fosfato.

El azul de metileno también se utiliza como un complemento de la tinción de Gram, especialmente para la tinción de bacterias Gram-negativas, tales como *Haemophilus influenzae* y especies de *Neisseria*. El colorante puede revelar la morfología de las bacterias fusiformes y espiroquetas (de infecciones orales, tales como la angina de Vincent) que apenas puede distinguirse con la tinción de Gram (36). El colorante también se utiliza para detectar la presencia de leucocitos en heces, que puede delatar la presencia de una enteropatía invasiva.

**Fotografía 10.** Bacilos con gránulos metacromáticos teñidos con azul de metileno de Loeffler/L. Corrales.



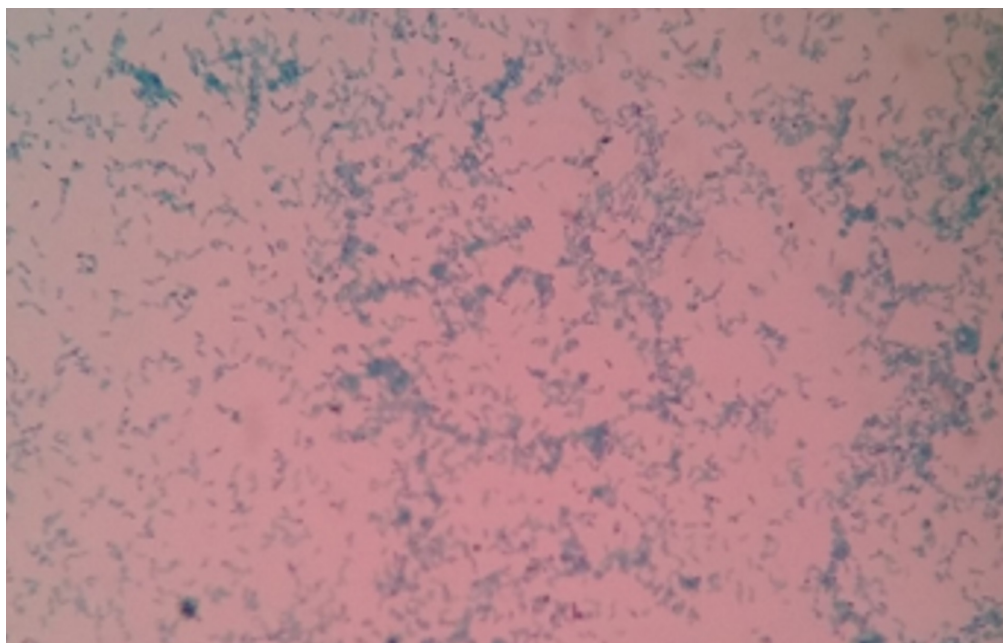
### *Coloración de Van Stoltemberg*

También es una coloración específica para gránulos metacromáticos y tal como se estableció anteriormente, estos gránulos están formados por polifosfato y polímeros lineales del ortofosfato, los cuales representan una asociación molecular osmóticamente inerte de almacenamiento de fosfato, debido a que la parte central de los gránulos está constituida por un núcleo de macromoléculas de lípidos y proteínas (37).

Las inclusiones son cuerpos inertes en las células. Muchas de ellas son materiales alimenticios de reserva, dado que se acumulan durante tiempo de aporte nutricional y

disminuye la duración de la inanición. El carácter de las inclusiones varía con el organismo. En muchas especies bacterianas y en hongos, algas y protozoarios aparecen gránulos de volutina, llamados gránulos metacromáticos. Se les colorea intensamente con colorantes básicos debido a la alta concentración de ácido fosfórico polimerizado, conocido como polifosfato. El colorante Van Stoltemberg está compuesto por fucsina y verde de malaquita (colorantes catiónicos básicos). Su fundamento radica en que la fucsina es tomada por el polifosfato y de esta forma se observan los gránulos de color rojizo y el verde de malaquita es tomado por el cuerpo del bacilo, viéndose de color verde (22, 38).

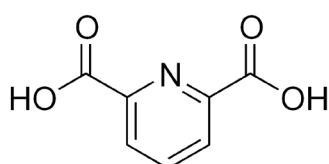
**Fotografía 11.** Bacterias con gránulos metacromáticos teñidas con Van Stoltemberg/ L. Corrales.



## Coloración de Shaeffer Foulton

Las esporas son estructuras bacterianas constituidas por proteínas, calcio y ácido dipicolínico ( $C_{10}H_8O_4N_2$ ).

**Figura 11.** Estructura Molecular Acido Dipicolínico.



Este compuesto engloba el ADN y causa resistencia a factores ambientales o condiciones adversas, tales como altas temperaturas, baja humedad, radiaciones y agentes químicos. Según su localización, se distinguen tres tipos de esporas: centrales, subterminales y terminales, que presentan en particular los géneros *Bacillus* y *Clostridium*.

El proceso de esporulación conlleva una serie de eventos codificados desde el genoma bacteriano e incluye los siguientes pasos: 1. El cese en la provisión de los nutrientes, lo cual implica que el crecimiento bacteriano se detenga. 2. La formación de un filamento axial de material genético. 3. El plegamiento de la membrana celular para englobar el ADN y producir el septo. 4. El crecimiento de la membrana continua, formando la membrana externa o exina. Ubicada por fuera del córtex también se encuentra una segunda membrana denominada interna o intina. 5. Producción del córtex en la espora, situado entre las dos membranas (exina e intina), donde se acumula el calcio y el

ácido dipicolínico, 6. Formación de la cubierta de proteínas. 7. Formación del exosporio que corresponde a la última capa. Y 8. Liberación de la espora (34). Entre las transformaciones químicas y físicas que acompañan a los cambios morfológicos se encuentran: 1. Concentración del material proteico en la zona de formación de la espora. 2. En razón de la concentración del material, aumenta el índice de refracción de la zona. 3. Utilización del material de reserva (ácido poli-beta-hidroxibutírico, en anaerobios y polisacáridos en aerobios) para procesos de degradación y síntesis. 4. Síntesis de ácido dipicolínico, específico de las esporas y que no se encuentra en las células vegetativas. Este ácido se combina en forma de quelato con iones  $Ca^{++}$ ; se localiza en el protoplasto de las esporas termorresistentes y 5. Liberación por autólisis de las células maternas (39).

Las esporas son altamente impermeables a los colorantes, de manera que con las técnicas de coloración comunes como la de Gram, se observan como regiones sin teñir dentro de las células coloreadas y por esto se deben utilizar métodos especiales y selectivos de coloración. Una vez coloreada, la espora resiste fuertemente la decoloración y el contraste.

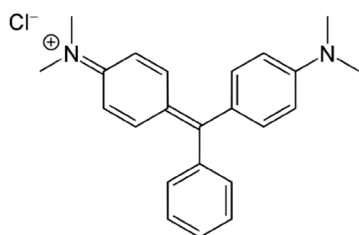
La tinción selectiva de Shaeffer Foulton (40) para esporas se fundamenta en que el verde de malaquita es un colorante débilmente básico (tiene una carga positiva débil) y, por tanto, se une débilmente a la bacteria de tal forma que penetra en las células vegetati-



vas y cuando se calienta la preparación por cierto tiempo también penetra las esporas, ya que el calor modifica la permeabilidad de estas y permite la entrada del colorante a través de sus capas externas. Es utilizado como colorante primario y durante el lavado con agua, el verde malaquita se elimina de las células vegetativas, pero no de la espora. Aquí es donde entra el colorante de contraste fucsina de Shaeffer Foulton, que solo puede teñir a las células vegetativas decoloradas por acción del agua (41).

El verde de malaquita en su forma incolora ingresa al citoplasma de la célula debido a su polaridad y por atracciones de tipo catiónico propiciadas por el calor, reacciona y colorea el interior de las células vegetativas y las esporas. Al lavarlo con agua se aumenta la polaridad (42, 43) y el colorante se disuelve y sale del interior de la célula, pero no de la espora debido a la presencia de los cúmulos de quelatos que se forman entre el ácido dipicolínico y el calcio. La acción de la fucsina se verifica con la coloración exclusiva de las células vegetativas.

**Figura 12.** Estructura molecular verde de malaquita.



**Fotografía 12.** Células bacterianas con espora teñidas con Shaeffer Foulton / L. C. Corrales.



En la Fotografía 12, se observan bacterias de forma bacilar con presencia de esporas, la célula vegetativa se tiñe de rojo y la espора de verde.

### *Coloración de Ziehl Neelsen (BAAR)*

Es una tinción diferencial utilizada para la identificación de bacterias que cuentan con la propiedad fisicoquímica de ser ácidos alcoholes resistentes (BAAR); y por lo tanto, no son reactivas con la fucsina básica. Un ejemplo lo constituye el género *Mycobacterium*.

La pared de estas bacterias está constituida por péptidoglicano unido mediante enlaces covalentes a un polímero de ácidos micólicos que a su vez se asocian a unidades de azúcar como galactosa-arabinosa. A este tipo de macromoléculas se les ha asignado el nombre general de “arabinogalactano”, el cual debido al tamaño y al efecto estérico le confiere carácter hidrofóbico a la bacteria.

Químicamente, los arabinogalactanos corresponden a glucoproteínas en las que la proporción del carbohidrato es muy superior con respecto a la parte proteica, lo cual le otorga a este tipo de moléculas gran solubilidad en agua (8, 44, 45).

A su vez, los ácidos micólicos están constituidos por arabinosas distales, que forman ésteres de ácidos grasos alfa ramificados y beta hidroxilados de 60 a 90 átomos de carbono. Estos ácidos forman una envol-

tura hidrófoba que se une en la parte más externa a lípidos complejos, los cuales son específicos de las micobacterias como miceratos de tiocerol, glucolípidos fenólicos, lipooligosacáridos, sulfolípidos y demicolato de trehalosa (20, 46). Adicionalmente, algunas micobacterias poseen sobre los lípidos superficiales, glucanos, proteínas como porinas y lipoarabinomananos, las cuales le confieren mayor capacidad hidrofóbica, debido a la presencia del efecto estérico y al alto peso molecular. Precisamente, esta resistencia polar es la que explica la ácido alcohol resistencia, ya que resisten la decoloración con ácidos fuertes después de ser coloreadas con solución de fucsina fenicada sometida a calentamiento.

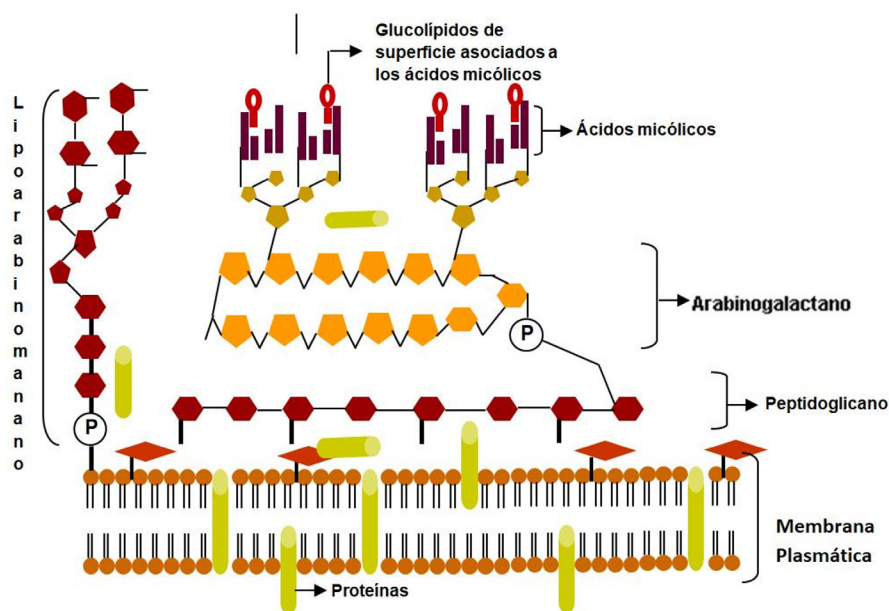
La coloración clásica de Ziehl-Neelsen se basa en el calentamiento inicial que permite aumentar tanto la energía cinética de las moléculas del colorante (fucsina de Ziehl Nielsen), como alcanzar rompimiento de las estructuras cristalinas de las ceras, favoreciendo así el ingreso del colorante a la pared bacteriana y al interior de la célula. Al suspender el calentamiento y enfriar con agua, se provoca una nueva solidificación de los ácidos grasos (ceras) de modo que el colorante queda atrapado dentro de dichas estructuras cristalinas y ya no puede salir de las bacterias (39, 45).

Al normalizarse la temperatura de la preparación, el compuesto lipídico impermeabiliza la pared a la acción del decolorante ácido, con lo cual el microorganismo se mantiene teñido. Las bacterias que resisten

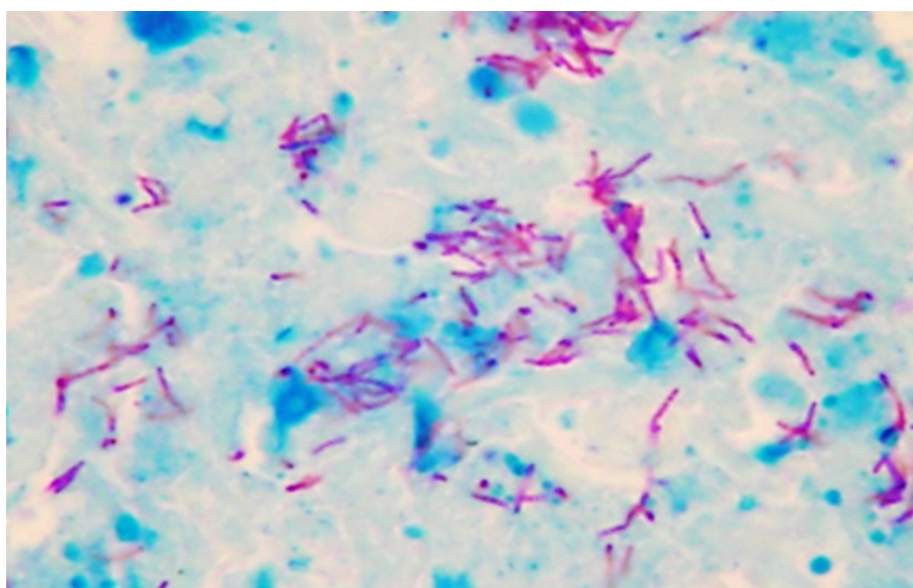
la decoloración son de color rojo y las que no, se ven de color azul con el colorante de contraste azul de metileno de Ziehl Neelsen. Así mismo, las células epiteliales y otras células, que no disponen de ácido micólico

en su pared o membrana, son decoloradas, después de teñidas por la fucsina, quedando incoloras y posteriormente tiñéndose de azul (47).

**Figura 13.** Pared de las micobacterias/ L.Corrales.









**Fotografía 13.** Células bacterianas coloreadas con Ziehl Neelsen /L.Corrales.



la decoloración son de color rojo y las que no, se ven de color azul con el colorante de contraste azul de metileno de Ziehl Neel-

sen. Así mismo, las células epiteliales y otras células, que no disponen de ácido micólico

**Figura 14.** Representación de la coloración de Ziehl Neelsen en bacterias ácido alcohol resistentes (BAAR) y bacterias ácido alcohol sensibles (BAAS)/ L. Corrales.

Colorantes	Bacterias AAR	Bacterias AAS
Colorante primario Fucsina fenicada		
Decoloración con alcohol ácido		
Coloración de Contraste azul de metileno de Ziehl Neelsen		

### Tinción con fluorocromos

La fluorescencia y la fosforescencia corresponden a fenómenos relacionados con la excitación de los átomos de ciertos materiales, la cual se evidencia en muchos casos con la emisión de luz. La diferencia entre los dos radica en que, en el primero, la emisión cesa en el momento en que se suspenda el estímulo, mientras que en el segundo, la emisión puede continuar por largo tiempo inclusive horas después y en la oscuridad (48).

Algunos colorantes denominados “fluorocromos” poseen propiedades fluorescentes, las cuales se hacen evidentes especialmente en el rango espectral correspondiente a la luz ultravioleta.

### Rodamina-auramina

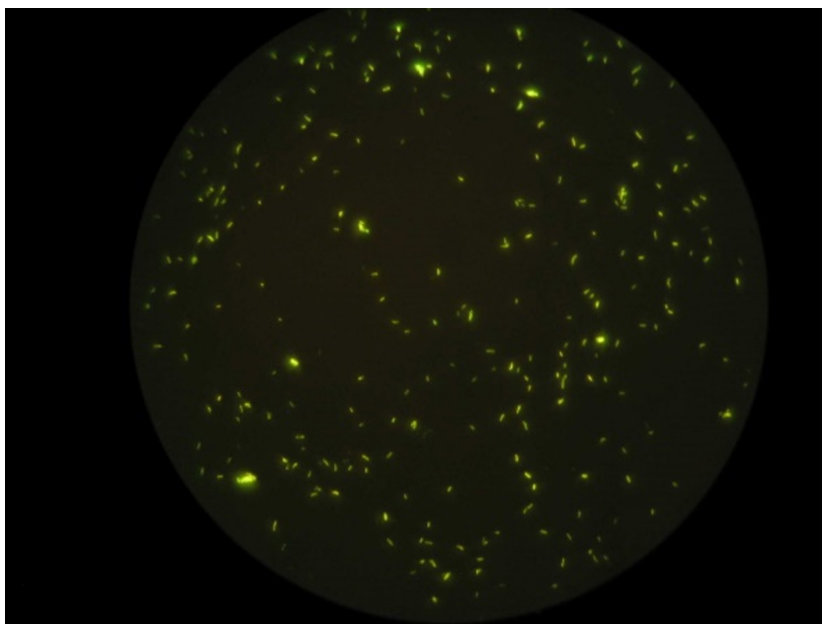
Los ácidos micólicos de las paredes celulares de las micobacterias poseen afinidad por los fluorocromos auramina y rodamina. Estos colorantes se fijan a las bacterias, que aparecen de color amarillo o naranja brillante contra un fondo verdoso. El permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ), empleado como contraste, evita la fluorescencia inespecífica. Todos los microorganismos ácido-alcohol resistentes, incluyendo los esporozoarios parásitos, se tiñen con estos colorantes.

Un aspecto importante de la coloración rodamina-auramina es que luego los frotis pueden ser reteñidos con la coloración de Ziehl-Neelsen o Kinyoun directamente sobre la tinción con el fluorocromo, si se eli-

mina antes el aceite de inmersión. De esta forma, los resultados positivos pueden ser confirmados con las coloraciones tradicio-

nales, que además permiten la diferenciación morfológica (48).

**Fotografía 14.** Células bacterianas coloreadas con Auramina Rodamina.



Tomado de:  
<https://n9.cl/v1lu>

En el estudio realizado por Zinserling y cols. (49) se demuestra la mayor sensibilidad de las coloraciones con fluorocromos frente a la de Ziehl Neelsen, concluyendo que “...existe evidencia de la capacidad de las micobacterias para tener polimorfismo morfológico y de la necesidad de aclarar la patogénesis de la tuberculosis”.

Además del sistema óptico para la identificación morfológica de los microorganismos, también se cuenta con métodos que hacen uso de microscopios electrónicos, los cuales, disponen de un flujo de electrones que choca contra la muestra, creando una

imagen aumentada. En este sistema, se utilizan lentes magnéticas para crear campos que dirigen y enfocan el haz de electrones y ocasionan un espacio vacío que impide que las cargas negativas sean desviadas por las moléculas del aire. Lo anterior puede causar absorciones y emisiones electrónicas en regiones diferentes al espectro visible, lo que implica que las técnicas de coloración para las muestras no sean necesarias (50-51); mientras que, para las observaciones en el microscopio óptico son requeridas, dado que las transiciones electrónicas ocurren a longitudes de onda dentro del espectro visible que se evidencia con los colores.



## Referencias

1. Decré D, Barbut F, Petit JC. Role of the microbiology laboratory in the diagnosis of nosocomial diarrhea. *Pathol Biol (París)*. 2000; 48: 733-744.
2. Retamales Castelletto E y Manzo Garay V. Recomendaciones para la tinción de frotis sanguíneos para la lectura del hemograma. Instituto de Salud Pública departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile., (Chile). 2015. Disponible en: <http://www.ispch.cl/sites/default/files/RECOMENDACIONES%20PARA%20LA%20TINCI%C3%93N%20DEL%20FROTIS%20SANGU%C3%8DNEO.pdf>. Consultado 20 de febrero de 2019.
3. Madison BM. Application of stains in clinical microbiology. *Biotech Histochem*. 2001; 76: 119-125.
4. Capilla Pérea P. Fundamentos de colorimetría. En: *Tecnología del color*. Universitat de València, Servei de Publicacions. 2002. 15-25.
5. D. Alonso Cerrón-Infantes\* y Miriam M. Unterlass\*. Ecofriendly synthesis of colorants. *Revista de Química PUCP*, 2018, vol. 32, n° 1
6. Flores B, E., Roque P, C., Ochoa L, R. Química del color, *Revista de Química*. Vol. IX. N° 2. diciembre de 1995 p 99-109.
7. Rivera Rojas L., Fundamentos de Química aplicados a las ciencias de la salud. Bogotá: Ediciones Unisalle., 2018.
8. Fesenden, R. Fesenden, J. Química Orgánica. 2da Edición. Grupo editorial Iberoamérica; 1983.
9. McMurry, J. Química Orgánica. 7ª edición. Cengage Learning Editores, S.A. México. 2008.
10. Magdalena M. La Química y los Colorantes en “El carbono y sus compuestos” publicación del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey. 2009. Disponible en: [http://www.academia.edu/1844623/La\\_Qu%C3%ADmica\\_Org%C3%A1nica\\_y\\_los\\_Colorantes](http://www.academia.edu/1844623/La_Qu%C3%ADmica_Org%C3%A1nica_y_los_Colorantes). Consultado 20 de febrero de 2019.
11. Penney DP, Powers JM, Frank M, Churukian C (2002) analysis and testing of Biological Stains - the Biological Stain Commission Procedures. *Biotechnic & Histochemistry* 77: 237-275
12. Vázquez, C. Martín, A. de Silóniz, MI. Serrano, S. Técnicas básicas de Microbiología Observación de bacterias. *Reduca (Biología)*. Serie Microbiología. 3 (5): 15-38, 2010.
13. Piña Mondragón, S. Decoloración biológica del colorante azul directo 2 en un filtro anaerobio/aerobio. TESIS de grado, PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. P. 9 -12. 2007. Disponible en <http://www.ptolomeo.unam.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/132.248.52.100/1732/pi%C3%B1amondragon.pdf?sequence=1>. Consultado 20 de Febrero de 2019.
14. Christie, R., Colour chemistry Royal society of chemistry. United Kindgom. (2001), 46, 118-120
15. Calvo GA, Esteban RFJ, Montuenga FL. Técnicas en histología y biología celular. 2nd ed. Madrid Spain: Elsevier; 2009.
16. Forbes, B. Sahm, D. Weissfeld, A. Diagnóstico Microbiológico. Editorial panamericana. 2009.
17. Reynoso, M. Magnoli, C., Barros, G. Mirta, S. Manual de Microbiología General Demo. Unirio Editora. 2015. Disponible en: <https://www.unrc.edu.ar/unrc/comunicacion/editorial/repositorio/978-987-688-124-1.pdf>. Consultado: 26 de Febrero de 2019.
18. Tortora, J. Funke, B. Case, C. Introducción a la Microbiología. 9ª edición. Editorial Médica Panamericana. 2007.
19. Gamazo, C. Lopez, I. Diaz R. Manual práctico de Microbiología. 3ª edición. Editorial Masson. 2005
20. Corrales, L. Ávila de Navia, S. Estupiñan, S. Bacteriología teoría y práctica. Editorial. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá. 2013.
21. Guarner J, Brandt ME. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clin Microbiol*



- Rev. 2011; 24: 247-280 ( montajes en fresco – hongos)
22. Koneman, E. Diagnóstico Microbiológico. 6ª edición. Editorial medica panamericana. España. 2008.
23. Popescu A, Doyle RJ. The Gram stain after more than a century. Biotech Histochem. 1996; 71: 145-151.
24. Beveridge TJ. Mechanism of Gram variability in select bacteria. J Bacteriol. 1990; 172: 1609-1620.
25. Nagata K, Mino H, Yoshida S. Usefulness and limit of Gram staining smear examination. Rinsho Byori. 2010; 58: 490-497.
26. BROCK, Biología de los microorganismos. Madigan, M.T., Martinka, JM y Parker, J. 12ª edición. Pearson Pretice Hall. 2009.
27. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol Mol Biol Rev. 1998; 62: 1094-1156. (Mycoplasmas)
28. Castro, AM. Bacteriología Médica basada en problemas. 2ª edición. Editorial manual moderno. 2014.
29. Martín-Sánchez Manuela, Martín-Sánchez María Teresa, Pinto Gabriel. Lugol reactive: History of Discovery and teaching applications. Educ. quím [revista en la Internet]. 2013 Ene [citado 2017 Abr 26] ; 24( 1 ): 31-36. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-893X2013000100006&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-893X2013000100006&lng=es).
30. Martín- Sánchez, M. Martín- Sánchez, MT. Pinto, G. Reactivo de Lugol: Historia de su descubrimiento y aplicaciones didácticas. Educ. quím. 24 (1), 31-36, 2013. Universidad Nacional Autónoma de México. Publicado en línea el 25 de noviembre de 2012, ISSNE 1870-8404
31. Luis SBM, Altava B. Introducción a la química orgánica. Universitat Jaume;1997.
32. Breakwell DP, Moyes RB, Reynolds J. Differential staining of bacteria: capsule stain. Curr Protoc Microbiol. 2009. Appendix 3: p. Appendix 3I.
33. Fung DC, Theriot JA. Imaging techniques in microbiology. Curr Opin Microbiol. 1998; 1: 346-351.
34. Corbett, D., Roberts, I.S. Capsular polysaccharides in Escherichia coli. Adv Appl Microbiol 65: 1-26. 2008.
35. Atkins, J. Principios de Química. Los caminos del descubrimiento. 3ª edición. Editorial médica panamericana. 2006
36. Breakwell DP, Moyes RB, Reynolds J. Differential staining of bacteria: capsule stain. Curr Protoc Microbiol. 2009. Appendix 3: p. Appendix 3I.
37. Murray P. Manual of clinical microbiology. 9th ed. USA: American Society for Microbiology; 2007.
38. Montoya, H. Microbiología básica para área de la salud y afines. 2ª edición. Colección salud. Universidad de Antioquia. 2008.
39. Corrales, L. González, A. Ávila, S. Conceptos Básicos de Microbiología. Bogotá. Editorial Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 2008.
40. Gerard J., Introducción a la Microbiología, Novena Edición, 2007, P.69-72
41. Gamazo, C. Sánchez, S. Camacho, A. Microbiología basada en la experimentación. Editorial Elsevier. España. 2013.
42. Brown, T. Le May, H. Bursten, B. Burdge, J. Química la ciencia central. 9ª edición. Editorial Pearson. 2004.
43. Petrucci, R. Herring, F. Madura, J. Bissonnette, C. Química General. Principios y aplicaciones modernas. 11ª edición. Editorial Pearson. 2017.
44. Cordero, P. Verdugo, L. Apuntes de Bioquímica Humana. Metabolismo Intermedio. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad de Cuenca. Cuenca-Ecuador. 2006
45. Selvakumar N et al. Comparison of variants of carbolfuchsin solution in Ziehl-Neelsen for detection of acidfast bacilli. Int J Tuberc Lung Dis. 2005; 9: 226-229.

46. Murray, R. Bioquímica de Harper. 13era edición. Editorial manual moderno. 1994.
47. Salud OPDL. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Vol. 1. 2008.
48. Keller PJ. Imaging morphogenesis: technological advances and biological insights. *Science*. 2013; 340: 123-168.
49. Zinserling V, Agapov MM, Orlov AN. The informative value of various methods for identifying acid-fast bacilli in relation to the degree of tuberculosis process activity. *Arkh Patol*. 2018;80(3):40-45.
50. Ostos Ortiz, O., Rosas Arango, S., & González Devia, J. (2019). Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos. *NOVA*, 17(31), 129-163. Recuperado a partir de <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/950>
51. Calvo GA, Esteban RFJ, Montuenga FL. Técnicas en histología y biología celular. 2nd ed. Madrid Spain: Elsevier; 2009.

# Características bacteriológicas, físicas y pH del agua de consumo humano del municipio de Une-Cundinamarca

Bacteriological and physical characteristics and pH of water for human consumption in the municipality of Une-Cundinamarca

Sandra Mónica Estupiñán-Torres <sup>1</sup>, Sara Lilia Ávila de Navia <sup>2</sup>, Diego Barrera Aguirre <sup>3</sup>, Robinson Baquero Torres <sup>4</sup>, Delith Alexandra Díaz Ibañez <sup>5</sup>, Anthony Hever Rodríguez Ramírez <sup>6</sup>

## Resumen

**Objetivo.** Determinar características bacteriológicas, físicas y pH del agua para consumo humano que abastece al municipio de Une, Cundinamarca-Colombia. **Métodos.** Se tomaron 13 muestras de agua: 10 de la zona rural y 3 de la zona urbana. Del total de muestras tomadas en la zona rural, 7 no tenían ningún tratamiento, mientras que 3 tenían algún tipo de tratamiento. Las 3 muestras tomadas en la cabecera municipal, todas tenían tratamiento. Se utilizó la técnica de filtración por membrana para los análisis bacteriológicos, y los métodos nefelométrico, turbidimétrico y potenciométrico, para los análisis físicos y el pH. **Resultados.** Se obtuvo como resultado pH inferior a 6; 12 puntos superan el valor máximo de turbiedad y 5 puntos para la determinación de color. Se observó la presencia de Coliformes totales, *E. coli* y *Enterococcus* en las muestras analizadas, en cantidad que sobrepasa lo establecido en la normativa colombiana.

**Palabras claves:** calidad del agua, coliformes, *Enterococcus*, *E. coli*.

1. Grupo Calidad de aguas. Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6937-4567>

2. Grupo Calidad de aguas. Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6188-0086>

3. Annar Health Technologies.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2681-1384>

4. Colsanitas.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2870-9041>

5. Annar Health Technologies.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2681-1384>

6. Egresado Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Correspondencia: sestupinan@unicolmayor.edu.co

## Abstract

**Objetivo.** To determine bacteriological and physical characteristics and pH of water for human consumption that supplies the municipality of Une, Cundinamarca-Colombia.

**Methods.** Thirteen water samples were taken: 10 from the rural area and 3 from the urban area. Of the total number of samples taken in the rural area, 7 had no treatment at all, while 3 had some type of treatment. The 3 samples taken in the municipal capital, all had treatment. The membrane filtration technique was used for bacteriological analysis and the nephelometric, turbidimetric and potentiometric methods for physical analysis and pH. **Results.** The result was pH lower than 6; 12 points exceed the maximum value turbidity and 5 points for the determination of color. The presence of total Coliforms, *E. coli* and *Enterococcus* was observed in the analyzed samples, in an amount that surpasses the established in the Colombian regulations.

**Keywords:** water quality, coliforms, *Enterococcus*, *E. coli*.

## Introducción

En el mundo existen 2100 millones de personas que no tienen disponibilidad de agua potable y disponible en el hogar y 4500 millones, carecen de un saneamiento seguro (1), las enfermedades diarreicas son la segunda mayor causa de muerte de niños menores de cinco años, y ocasionan la muerte de 525 000 niños cada año (2). En Latinoamérica, las EDA continúan siendo un problema de salud pública (3).

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), el 85% de la población no cuenta con un sistema de abastecimiento de agua potable adecuado; por lo tanto, un alto porcentaje de personas está en grave riesgo de sufrir enfermedades de transmisión hídrica. Actualmente, cerca de 77 millones de personas no cuentan con ser-

vicio de agua potable; de éstas, el 7% pertenecen a la zona urbana y 39% a la zona rural, alrededor del 11% obtiene su agua por sistemas denominados de “fácil acceso”, los cuales son utilizados para satisfacer sus necesidades y actividades diarias aun cuando no cumplan los requerimientos mínimos para garantizar su salud, lo cual significa un riesgo, ya que estos métodos son deficientes y no cuentan con ningún control o vigilancia por organismos del estado (4).

Une, en el departamento de Cundinamarca, es un municipio formado por la cabecera municipal y 17 veredas. Un porcentaje medio (40%) tiene acceso a alcantarillado, fundamentalmente las viviendas de la zona urbana. El acueducto tiene una cobertura de 100% para la zona urbana, pero en la zona rural el mayor porcentaje de viviendas se abastece a través de un río o manantial (27% del total del municipio) (5).

## Materiales y métodos

La toma de las muestras se realizó en los siguientes puntos (ver Tabla 1)

**Tabla 1.** Posición geográfica de los puntos seleccionados para el muestreo.

MX	VEREDA	SITIO	COORDENADAS	
			Latitud	Longitud
1*	Puente Tierra	Escuela	4°24'57.87"N	74° 1'38.31"O
2*	Timasita	Casa 1	4°25'7.58"N	74° 1'6.58"O
3*	Timasita	Casa 2	4°25'6.96"N	74° 1'7.85"O
4	San Isidro	Casa 1	4°23'43.08"N	74° 1'40.95"O
5	San Isidro	Casa 2	4°23'49.87"N	74° 1'43.48"O
6	Olla de Pastores	Represa del Chocolate	4°22'49.15"N	74° 1'50.83"O
7	Olla de Pastores	Casa 1	4°23'26.69"N	74° 1'30.22"O
8	Olla de Pastores	Casa 2	4°23'41.39"N	74° 1'26.01"O
9**	Casco Urbano	Asadero de Pollos	4°24'13.84"N	74° 1'27.46"O
10**	Casco Urbano	Restaurante	4°24'9.20"N	74° 1'31.38"O
11*	Salitre	Escuela	4°23'28.47"N	74° 0'50.96"O
12	Salitre	Nacedero	4°23'22.07"N	74° 0'45.18"O
13	Casco Urbano	Fuente Alterna*	4°24'19.29"N	74° 1'39.77"O
* Agua con tratamiento				
** Agua con tratamiento Cabecera Municipal				

Para realizar el análisis microbiológico se empleó la técnica de filtración por membrana para el recuento de coliformes totales, *Escherichia coli* y *Enterococcus*. Como controles positivos se utilizaron las cepas de *E. coli* ATCC 35218 y *E. faecalis*, proporcionadas por el cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Los análisis fisicoquímicos de pH, turbiedad y color se

realizaron por los métodos potenciométrico, turbidimétrico y fotométrico respectivamente.

Para la realización del mapa de riesgo, se hizo una observación detallada de todos los puntos seleccionados para la toma de muestra. Además, se tuvieron en cuenta diversos factores que se consideran como posibles

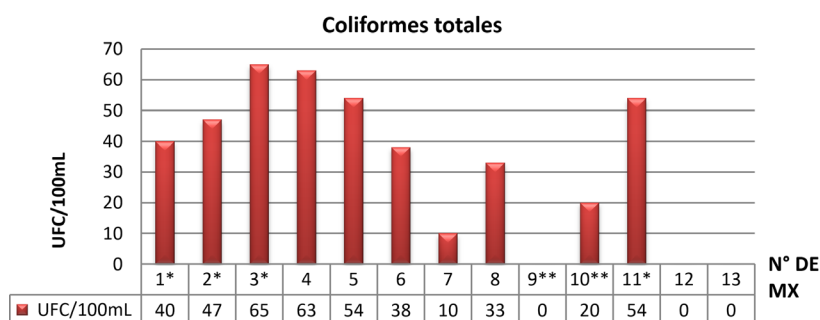
causas de contaminación como lo fueron: estado de la tubería, canalización de aguas negras, desechos de basura, pozos sépticos, presencia y mantenimiento de animales domésticos, de granja, entre otros.

## Resultados

En la Figura 1 se observan los resultados de coliformes totales obtenidos. Allí se eviden-

cia que 10 de los 13 puntos de muestreo presentan recuentos superiores a los establecidos en la norma. Es de resaltar que se presentaron recuentos altos tanto en aguas tratadas, como en aguas sin tratamiento. Solamente los puntos 9, 12 y 13 cumplen con la normatividad. Estos puntos corresponden al casco urbano (agua tratada), al nacedero del Salitre y al casco urbano (agua no tratada).

**Figura 1.** Recuentos obtenidos (UFC/100mL) de Coliformes totales.



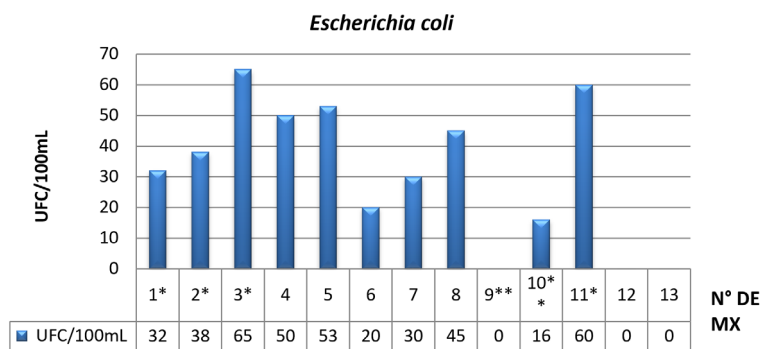
\* Agua con tratamiento

\*\* Agua con tratamiento Cabecera Municipal

Para el indicador *Escherichia coli*, se observa que las muestras 9, 12 y 13 cumplen con lo estipulado en la Resolución 2115 del 2007.

Las otras 10 muestras, al igual que en el caso de coliformes totales, no cumplen con la normatividad.

**Figura 2.** Recuentos obtenidos (UFC/100mL) de *Escherichia coli*.



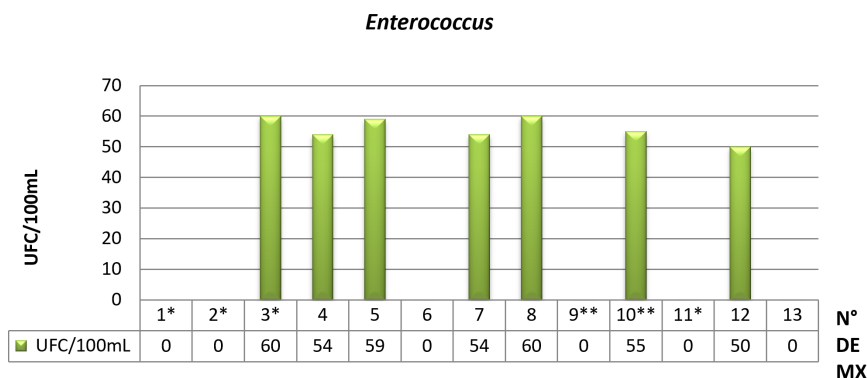
\* Agua con tratamiento

\*\* Agua con tratamiento Cabecera Municipal



En la Figura 3 se encuentran los resultados obtenidos para *Enterococcus*. En este caso solo seis muestras (1\*, 2\*, 6, 9\*\*,11\*,13) no presentaron recuentos.

**Figura 3.** Recuentos obtenidos (UFC/100mL) de *Enterococcus*.

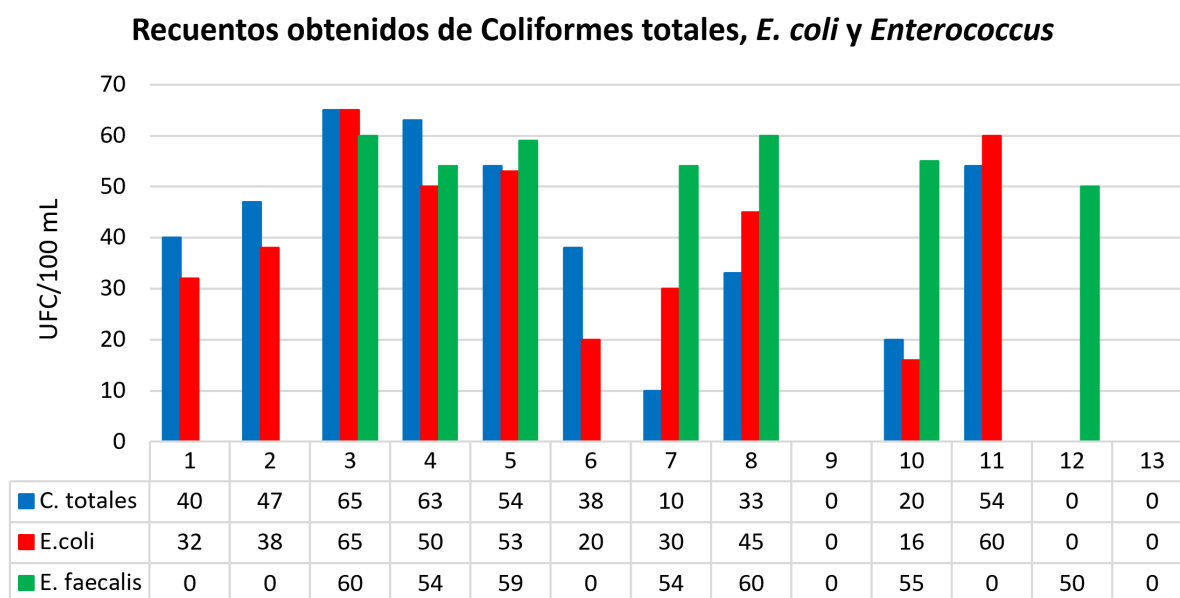


\* Agua con tratamiento

\*\* Agua con tratamiento Cabecera Municipal

En la Figura 4 se comparan los resultados obtenidos para los 3 indicadores usados, en donde el punto 9 y el punto 13 son los únicos que cumplen con los parámetros bacteriológicos establecidos para el agua para consumo humano.

**Figura 4.** Recuentos obtenidos de Coliformes totales, *E. coli* y *Enterococcus*.



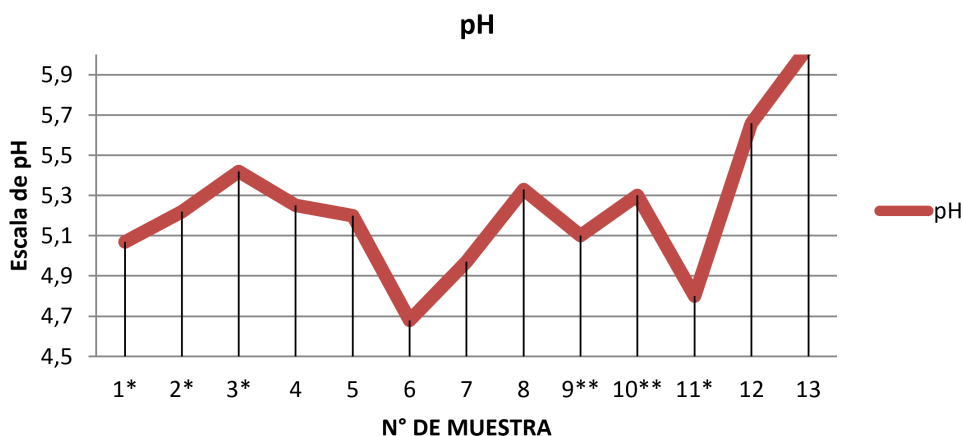
\* Agua con tratamiento

\*\* Agua con tratamiento Cabecera Municipal

En relación con los parámetros fisicoquímicos evaluados, en la Figura 5 se observa que ningún punto analizado se encuentra entre

6,5 y 9,0; rango establecido en la Resolución 2115 del 2007.

**Figura 5.** Resultados de pH en las muestras analizadas.



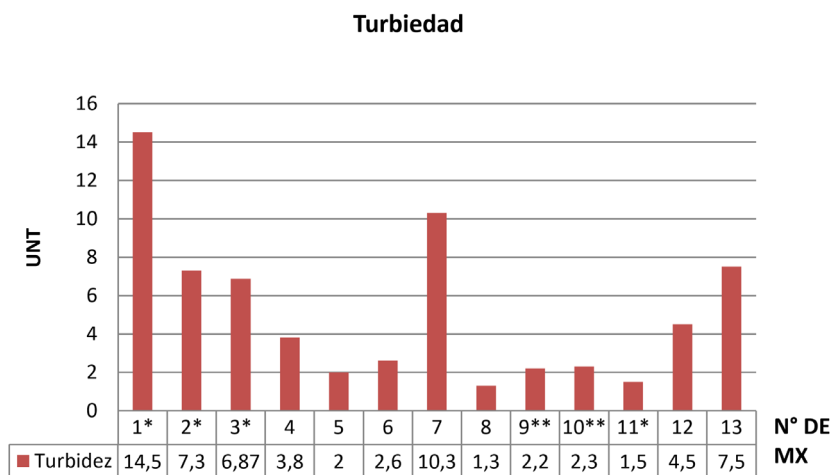
\* Agua con tratamiento

\*\* Agua con tratamiento Cabecera Municipal

Para el caso de la turbiedad, solo las muestras 5, 8 y 11 se encuentran dentro de los

valores máximos permitidos por la norma colombiana (2 UNT) (ver Figura 6).

**Figura 6.** Resultados de turbiedad en las muestras analizadas.



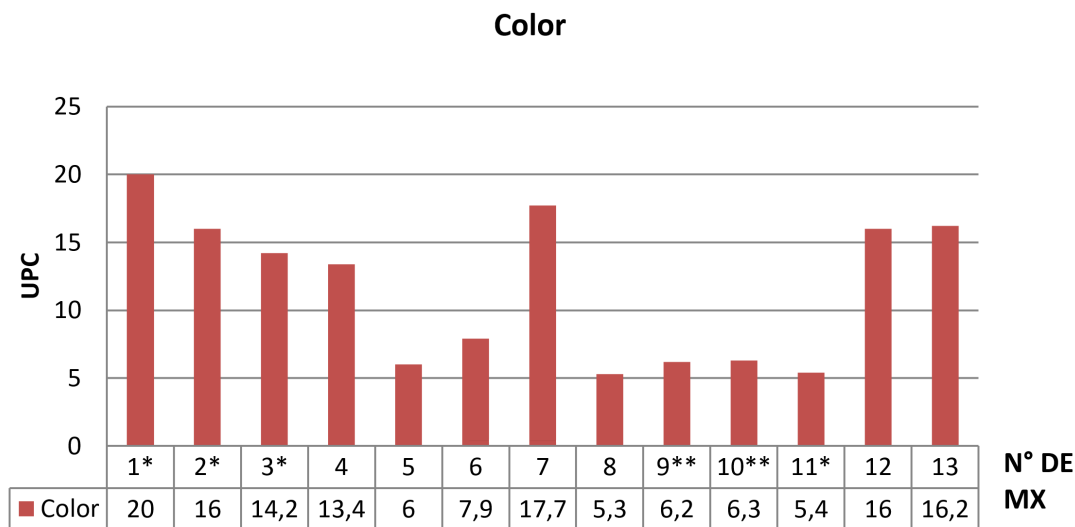
\* Agua con tratamiento

\*\* Agua con tratamiento Cabecera Municipal

En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos para el color, en donde las muestras 1, 2, 7, 12 y 13 superan el valor máxi-

mo permisible (15 UPC) según la Resolución 2115 del 2007.

**Figura 7.** Resultados de color en las muestras analizadas.



\* Agua con tratamiento








\*\* Agua con tratamiento Cabecera Municipal

Para la realización del mapa de riesgo se estableció una tabla de convenciones para

identificar en el mapa los parámetros encontrados (ver Tabla 2).

**Tabla 2.** Convenciones Mapa de riesgo.

PARÁMETROS	CONVENCIONES
Tubería de Material Galvanizado	
Tanque	
Pozo	

PARÁMETROS	CONVENCIONES
Agua Tratada	
Aves	
Potreros	
Animales domésticos	
Corrales	
Tubería PVC Fisuras	
Tubería PVC con reparaciones insuficientes	

El recorrido inició desde el punto principal de abastecimiento del municipio La Represa del Chocolate, ubicada a 5 Km al sur del municipio de Une; en la región denominada Nacadero el Santuario. A partir de este punto se hizo el recorrido por la tubería y se determinó que el primer factor de contaminación son las aves nativas residentes de la represa.

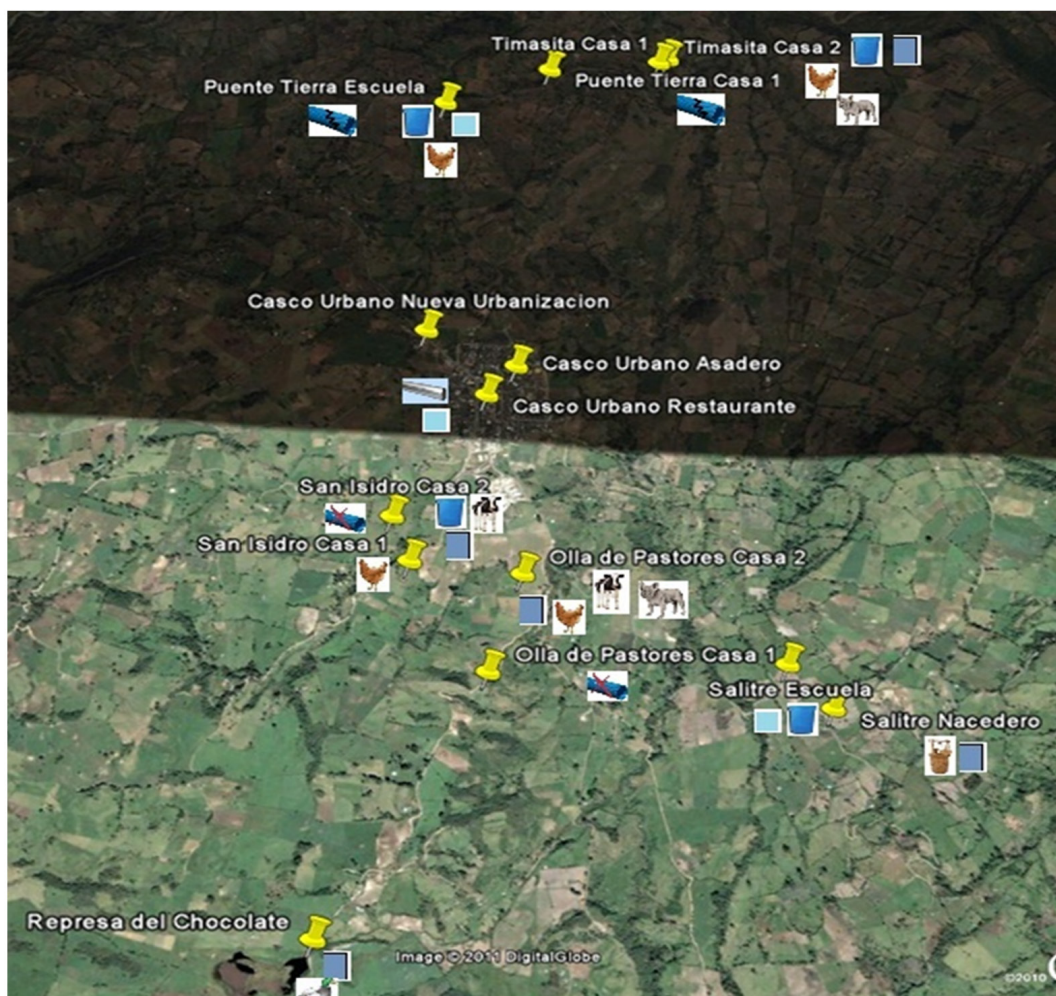
Cerca de la represa del chocolate, a 3.2 Km del municipio de Une se encuentra ubicada la vereda Olla de Pastores. El agua viene directamente de la represa antes del paso por la planta del tratamiento. Allí el factor de riesgo es el tanque de almacenamiento subterráneo, que es hecho de concreto y parcialmente cubierto con una tapa oxidada.

El campo agrícola por el cual tiene que cruzar la manguera que viene de la represa para poder abastecer a la vereda de San Isidro, es una de las posibles causas de contaminación, ya que se encontraron roturas y fisuras en la tubería que están en contacto con el lodo por debilitamiento de la tierra. En la vereda del salitre y en el casco urbano del municipio, no se encontraron posibles factores de contaminación.

Saliendo del municipio está la vereda de Puente Tierra la cual se abastece de agua tratada por los mismos habitantes, encon-

trando como factores de riesgo los animales de granja, ya que los criaderos y galpones se localizan cerca de las tuberías de abastecimiento de agua, que poseen grandes fisuras. Por otro lado, uno de los puntos de muestreo es la escuela de la vereda la cual posee un tanque de abastecimiento en mal estado y de difícil acceso para realizar una limpieza intensiva periódica. Por último, en la vereda Timasita no se evidenciaron posibles factores de riesgo de contaminación. Finalmente, con los datos obtenidos se estableció el mapa de riesgo (ver Figura 8).

Figura 8. Mapa de Riesgo.



## Discusión

El 76,9% de las muestras analizadas presentaron recuentos que oscilaron entre 40 y 65 UFC/100 mL para coliformes totales, mientras que en solo tres puntos de muestreo (23,1%) el recuento para este indicador fue 0 UFC/ 100 mL. Resultados similares han sido reportados por Ávila y Estupiñán en 2016, donde se encontró que en el acueducto de la vereda El Charco (municipio de San Miguel de Sema, Boyacá), los recuentos de coliformes totales estuvieron entre 0 y 96 UFC/100 mL (6). En un estudio realizado en un acueducto del municipio de San Antonio de Tequendama, Cundinamarca, se encontró que el 100% de las muestras contenían coliformes totales, con recuentos que oscilaban entre 12 y 67 UFC/100 mL (7). En contraste con lo encontrado en el presente estudio, en el agua de los tanques de abastecimiento de la Universidad Distrital, sede La Macarena en Bogotá, los recuentos de coliformes totales encontrados para el año 2007, estuvieron entre 0 y 4 UFC/100 mL (8). Los hallazgos anteriores coinciden con lo reportado para Colombia por Carrasco, quien encuentra un gran desequilibrio en cuanto a la calidad del agua suministrada en el área rural; mientras que en el área urbana el Índice de Riesgo de Calidad del Agua (IRCA) promedio en 2012 fue del 13,2 %, considerado nivel de riesgo bajo, en el área rural el valor fue de 49.8 %, es decir nivel de riesgo alto (9).

Para *Escherichia coli* los recuentos estuvieron entre 32 y 65 UFC/100mL en 10 muestras

(76,9%), las muestras 9, 12 y 13 presentaron recuentos de 0 UFC/100mL, tanto para este indicador como para coliformes totales; por lo tanto, estos tres puntos cumplen con lo establecido en la normativa colombiana de la Resolución 2115 del 2007 (10). Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Ávila y Estupiñán, en donde el 86,6% de las muestras de agua usada para el consumo de los habitantes de San Antonio de Tequendama, presentó *E. coli* (7). En contraste, en el estudio realizado en el municipio de San Miguel de Sema en Boyacá, todas las muestras fueron negativas para *E. coli* (6)

Los anteriores resultados indican que el agua está contaminada, las fuentes de contaminación pueden incluir fugas del alcantarillado y desechos animales, entre otros. Estos contaminantes pueden ingresar al suministro de agua a través de grietas o agujeros en la red de distribución. La presencia de bacterias coliformes fecales o *E. coli* en un sistema de agua indica una contaminación reciente (debido a que son bacterias de corta duración) provenientes de heces humanas o animales de alcantarillas, sistemas sépticos y corrales o patios de animales, entre otros (11).

Según la NTC 813 de 1994 (12), que evalúa en uno de sus parámetros la presencia de *Enterococcus*, ninguna muestra de agua potable para consumo humano debe presentar crecimiento de estos microorganismos. En el presente estudio, el 76,9% de las muestras presentaron recuentos entre



50 y 60 UFC/100mL. En un estudio realizado por Ávila y cols., se encontró que los recuentos de esta bacteria oscilaban entre 2 y 240 UFC/100 mL (6). Estos microorganismos presentan una mayor resistencia que las bacterias coliformes frente a factores como la temperatura y el pH, son más persistentes en aguas contaminadas, y su presencia se asocia a contaminación fecal antigua, ya sea de origen humano o animal (13).

En cuanto a los análisis de los parámetros fisicoquímicos, los resultados obtenidos para el pH oscilaron entre un rango de 4.0 a 6.0 con un promedio de 5.23. Estos valores son inferiores al permitido en la normativa colombiana que es 6.5 a 9.0 (10). Estos resultados contrastan con los obtenidos en el acueducto rural de la vereda el Limón, en el municipio de San Juan de Rioseco (14) donde el 100% de las muestras cumplen con la normatividad.

Un factor importante para el agua de consumo humano es su turbidez. Esta es producida por partículas suspendidas como arcilla, compuestos coloreados y microorganismos (15). Para este parámetro, el 76,9% de las muestras de agua de Une no cumple con lo establecido en la normativa colombiana (10) La turbiedad se relaciona con deficiencias en el proceso de potabilización, específicamente con la falta de infraestructura de los acueductos para la remoción de sólidos (14). Además, los altos niveles de turbidez disminuyen la desinfección por la adicción del cloro (15).

Los resultados obtenidos para el parámetro de color aparente muestran que el 38,4% de las muestras analizadas, superaron el valor máximo permisible según Resolución 2115/2007 (10). El color natural del agua puede alterarse por factores como la descomposición de la materia, materia orgánica del suelo, presencia de hierro, manganeso y otros compuestos metálicos, además de factores como el pH y la temperatura (16).

### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y sus autores manifiestan no tener conflicto de intereses.

### Referencias

1. Osseiran N. 2017. 2100 millones de personas carecen de agua potable en el hogar y más del doble no disponen de saneamiento seguro. Comunicado de prensa GINEBRA. <https://www.who.int/es/news-room/detail/12-07-2017-2-1-billion-people-lack-safe-drinking-water-at-home-more-than-twice-as-many-lack-safe-sanitation>.
2. Enfermedades diarreicas. 2 de mayo de 2017. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.
3. Herrera-Benavente IF, Comas-García A, Mascareñas-de los Santos AH. 2018. Impacto de las enfermedades diarreicas agudas en América Latina. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*. 31 (1). pp. 8-16.4.
4. Jouravlev A. 2004. Los servicios de agua potable y saneamiento en el umbral del siglo XXI.CEPAL –

- SERIE. Recursos Naturales e Infraestructura. Santiago de Chile.
5. Calderón Cubides A. 1999. Descentralización en salud en el municipio de UNE [ ensayo trabajo de grado especialista en gestión pública] Villavicencio: Escuela superior de administración pública ESAP. Facultad de estudios AVANZADOS programa de especialización en gestión pública Villavicencio, 1999 (17) Disponible en: [http://cdim.esap.edu.co/BancoMedios/Documentos%20PDF/descentralizaci%C3%B3n%20en%20salud%20en%20el%20municipio%20de%20une%20-20\(106%20p%C3%A1g%20-%20163%20kb\).pdf](http://cdim.esap.edu.co/BancoMedios/Documentos%20PDF/descentralizaci%C3%B3n%20en%20salud%20en%20el%20municipio%20de%20une%20-20(106%20p%C3%A1g%20-%20163%20kb).pdf).
  6. Ávila de Navia SL, Estupiñán-Torres SM, Díaz González L. 2016. Calidad bacteriológica del agua Vereda El Charco, San Miguel de Sema, Boyacá- Colombia. NOVA. 13 (25): 139-145.
  7. Ávila de Navia SL, Estupiñán Torres SM. 2010. Control bacteriológico del agua de la red de distribución “acueducto de las veredas Nápoles, Ponchos y Sebastopol” en San Antonio de Tequendama. NOVA. 8 (14): 220-228.
  8. Poveda MD, Beltrán HE, Giraldo G. 2010. Determinación de indicadores de contaminación fecal (coliformes fecales) en los tanques de abastecimiento de agua de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas Sedes Macarena A y B. Revista Científica. N° 12.
  9. Carrasco Mantilla W. 2016. Estado del arte del agua y saneamiento rural en Colombia. Revista de Ingeniería, n° 44, 2016, pp. 46-53
  10. Resolución 2115 de 2007 Diario Oficial No. 46.679 de 4 de julio. Ministerio de la Protección Social, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Por la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. Colombia - Bogotá: El Ministerio; junio 22 2007.
  11. Vendrell PF, Atilé JH. Coliform Bacteria in Your Water. University of Georgia. [https://secure.caes.uga.edu/extension/publications/files/pdf/C%20858-7\\_1.PDF](https://secure.caes.uga.edu/extension/publications/files/pdf/C%20858-7_1.PDF)
  12. Colombia. Comité Técnico de ICONTEC. Norma Técnica Colombiana número 813 de 1994. Normas Oficiales para la Calidad de Agua potable, por el cual se establecen los requisitos físicos, químicos y microbiológicos que debe cumplir el agua potable. Bogotá D.C.: ICONTEC; 1994
  13. Ávila de Navia SL, Estupiñán Torres SM. 2005. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. NOVA. 3 (4). 1-116.
  14. Enciso WE, Jiménez CE. 2017. Análisis de la calidad del agua del acueducto rural Vereda el limón, municipio San Juan De Rioseco-Cundinamarca. Universidad Distrital Francisco José De Caldas. Facultad De Medio Ambiente Y Recursos Naturales. <http://repository.udistrital.edu.co/bitstream/11349/13127/3/encisobarrag%c3%a1nwilson2018.pdf>
  15. Marcó L, Azario R, Metzler C, Garcia M. 2004. La turbidez como indicador básico de calidad de aguas potabilizadas a partir de fuentes superficiales. Propuestas a propósito del estudio del sistema de potabilización y distribución en la ciudad de Concepción del Uruguay (Entre Ríos, Argentina). Higiene y Sanidad Ambiental. 4: 72-82.
  16. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS/OPS). Tratamiento de agua para consumo humano. Manual I: Teoría. Capítulos 1 y 2 <http://www.cepis.org.pe/bvsatr/fulltext/tratamiento/manualII/filtrarapmanual2.html>

# Calidad bacteriológica del agua del humedal Gualí-Tres Esquinas, Funza, Cundinamarca

Bacteriological quality of the water of the Guali-Tres Esquinas Wetland, Funza, Cundinamarca

Sandra Mónica Estupiñán-Torres <sup>1</sup>, Anyi Jiobana Cepeda Ruge <sup>2</sup>, Adriana Marcela Hurtado Díaz <sup>3</sup>, Karen Dayana Vega Pinzón <sup>4</sup>

## Resumen

**Objetivo.** Realizar el diagnóstico de la calidad bacteriológica del agua del Humedal Gualí-Tres Esquinas, por medio de indicadores de aguas residuales (coliformes totales, *Escherichia coli* y *Enterococcus spp*). **Métodos.** Se tomaron catorce muestras de agua de diferentes puntos del humedal (7 en la zona Tres Esquinas y 7 en la zona del parque industrial Cofradía). El recuento de microorganismos se realizó por el método de filtración de membrana siguiendo el Standard Methods, los microorganismos fueron identificados mediante BBL Crystal. **Resultados.** El agua del Humedal Gualí-Tres Esquinas contiene un alto número de *E.coli*, coliformes totales y *Enterococcus spp.*, lo que confirma la contaminación de origen fecal en todo el ecosistema, los recuentos más altos se encontraron en la zona parque industrial La Cofradía para coliformes totales y *Enterococcus spp.* y en la zona de Tres Esquinas para *E. coli*.

**Palabras claves:** Humedales, indicadores de contaminación, coliformes, calidad del agua, filtración por membrana.

1. Grupo Calidad de aguas. Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6937-4567>

2. Vitalis S.A.C.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4853-2829>

3. Idime de occidente.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4426-517X>

4. Hospital Militar Central.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3783-8635>

Correspondencia: sestupinan@unicolmayor.edu.co

## Abstract

**Objective.** To evaluate the bacteriological quality of the water of the wetland Gualí-Tres Esquinas, using residual waters indicators (total coliforms, *Escherichia coli* and *Enterococcus*).

**Methods.** Fourteen water samples were taken from different points of the wetland (7 in the Tres Esquinas zone and 7 in the Cofradía industrial park zone). The count of microorganisms was made by the membrane filtration method following the Standard Methods, the microorganisms were identified by BBL Crystal. **Results.** The water of the Gualí-Tres Esquinas Wetland contains a high number of *E. coli*, total coliforms and *Enterococcus spp.*, confirming fecal contamination throughout the ecosystem, the highest counts were found in the La Cofradía industrial park zone for total coliforms and *Enterococcus spp.* and in the Tres Esquinas zone for *E. coli*.

**Keywords:** Wetlands, Pollution Indicators, Coliforms, Water Quality, Membrane Filtration..

## Introducción

Los humedales son ecosistemas de suma importancia para las especies de flora y fauna. Además, tienen un papel fundamental en procesos como la generación del ciclo hídrico y el mejoramiento del aire. Todos estos eventos ayudan a mantener el equilibrio biológico en los ecosistemas. Estos procesos se ven afectados por la contaminación que se genera debido a diferentes causas como son los desechos de aguas residuales procedentes de sectores aledaños, las cuales están cargadas de sedimentos y materia orgánica, la eliminación inadecuada de basuras y la sobre-explotación de diferentes recursos, entre otros (1).

Los humedales han sufrido en los últimos años cambios a causa de las actividades humanas producto de la apropiación y uso de

sus espacios públicos, tales como la utilización de tierras con fines agrícolas o ganaderos, la ampliación de zonas urbanas con fines industriales o de recreación y la alteración de los regímenes hidráulicos (2). Como consecuencia de estas acciones desmedidas se ha producido una alteración de la dinámica natural de las cuencas que reciben las aguas que alimentan a estos cuerpos hídricos y los cambios en la cobertura vegetal que aumentan la carga de sedimentos y modifican la capacidad de retención de las aguas (3).

La problemática del Humedal Gualí-Tres Esquinas comprende principalmente la contaminación debido al vertimiento de aguas residuales, basuras y desperdicios provenientes de la industria y de los habitantes del municipio de Funza, que llegan al humedal sin previo tratamiento. Además,

actualmente este cuerpo hídrico se encuentra en un proceso acelerado de deterioro, especialmente por el desarrollo urbanístico e industrial en las áreas de ronda del mismo y por las actividades agropecuarias y ganaderas.

Desde el punto de vista hidrológico, el Humedal Gualí-Tres Esquinas tiene una gran importancia a nivel regional, ya que a este cuerpo amortigua las crecientes y almacena el agua proveniente de las zonas altas. Igualmente, es indispensable para la operación del Distrito de Riego y Drenaje de La Ramada, de la cual se benefician predios de Funza y Mosquera que se dedican a las actividades agropecuarias (4).

Desde el año 2014, el Humedal Gualí-Tres Esquinas fue declarado como área de protección por la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (CAR), y desde ese momento se han adelantado varias acciones tendientes a la conservación de este ecosistema como la implementación de proyectos para su recuperación y posterior conservación que consisten en la limpieza del cuerpo hídrico y el control y vigilancia de los vertimientos de aguas residuales (5).

En el presente estudio se realizó el diagnóstico de la calidad bacteriológica del agua del Humedal Gualí-Tres esquinas, lo cual permitió hacer una determinación de su estado actual y contar con más información a fin de que se tomen medidas para disminuir los impactos en la salud del medio ambiente, de los habitantes del sector y de esta manera

vigilar por la conservación de este cuerpo de agua.

## ***Materiales y métodos***

Se utilizaron para el estudio 14 muestras de agua del Humedal Gualí-Tres Esquinas, 7 del sector Tres Esquinas y 7 de las zonas de recuperación del espejo de agua, que han sido previamente tratadas por la Empresa Municipal de Acueducto Alcantarillado y Aseo de Funza (EMAAF). Los procesos de tratamiento consistieron en eliminación de material vegetal y limpieza del Humedal. Estas zonas de recuperación se encuentran en el parque industrial La Cofradía hacia el municipio de Siberia.

**Tabla 1.** Coordenadas toma de muestra Zona Tres Esquinas y Parque Industrial La Cofradía.

ZONA	PUNTO DE MUESTREO	COORDENADAS
TRES ESQUINAS	1	N 4°42'4.7736" O 74°12'5.2776"
	2	N 4°42'4.7772" O 74°12'5.292"
	3	N 4°42'4.77" O 74°12'5.2956"
	4	N 4°42'7.5636" O 74°12'3.9024"
	5	N 4°42'8.0532" O 74°12'3.564"
	6	N 4°42'2.7396" O 74°12'4.0752"
	7	N 4°42'2.754" O 74°12'5.238"
PARQUE INDUSTRIAL LA COFRADÍA	8	N 4°43'35.6664" O 74°11'23.7768"
	9	N 4°43'36.1668" O 74°11'23.748"
	10	N 4°43'35.04" O 74°11'23.9064"
	11	N 4°43'36.2892" O 74°11'24.2412"
	12	N 4°43'36.8076" O 74°11'24.3492"
	13	N 4°43'37.1028" O 74°11'24.558"
	14	N 4°43'37.8048" O 74°11'25.0332"

La obtención de las muestras se realizó teniendo en cuenta la guía para la toma de muestras de agua del Ministerio de Salud de Colombia (Decreto 475 de 1998) (6) y las recomendaciones de Andreu y Camacho (7), según la Normatividad Ambiental vigente y la consignada en la Política de Humedales.

Se llevó a cabo la determinación de los indicadores bacterianos con las recomendaciones del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (8). Se empleó la técnica de Filtración por Membrana. Los medios utilizados para la enumeración de las bacterias indicadoras de contaminación

de aguas fueron: Agar Endo para coliformes totales, agar M-FC para *Escherichia coli* y Agar Azida para *Enterococcus spp.*

## Resultados

En todos los puntos de muestreo analizados se encontraron recuentos de los tres indicadores, a excepción del punto 8, ubicado en la zona del parque industrial La Cofradía, en donde no se logró la recuperación de coliformes fecales ni *E. coli* (ver Tabla 2).



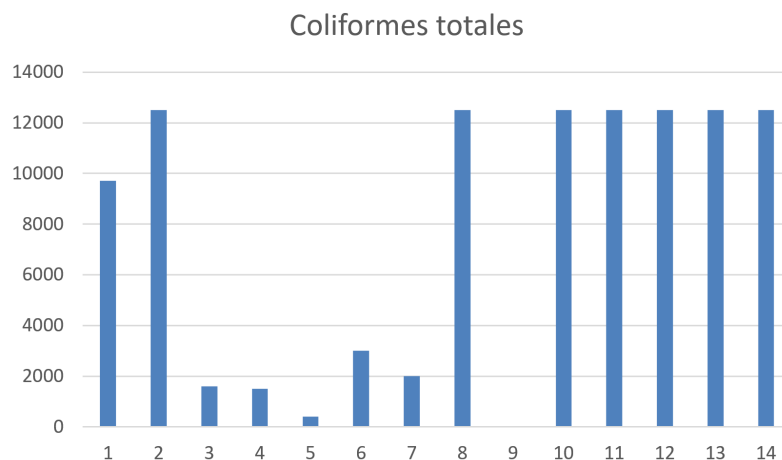
**Tabla 2.** Recuento UFC/100mL, muestras de la zona Tres Esquinas, Funza, Cundinamarca.

ZONA	PUNTO DE MUESTREO	RECuento EN UFC/100mL		
		Coliformes totales	Escherichia coli	Enterococcus spp.
TRES ESQUINAS	1	9700	4700	4800
	2	12500	4500	3300
	3	1600	15900	7400
	4	1500	16700	7400
	5	400	3600	100
	6	3000	3500	1800
	7	2000	4900	7400
PARQUE INDUSTRIAL LA COFRADÍA	8	12500	1200	18100
	9	0	0	18100
	10	12500	1200	18100
	11	12500	1200	18100
	12	12500	1200	18100
	13	12500	1200	18100
	14	12500	300	18100

En la Figura 1 se observa que en los puntos 1, 2, 8, 10, 11, 12, 13 y 14 se presentaron los más altos recuentos de coliformes totales. Los puntos 1 y 2 corresponden a la zona de Tres Esquinas y los restantes a la zona del

parque industrial La Cofradía. En el punto 9 no se recuperaron coliformes totales. Los recuentos para este indicador están entre 0 y 12500 UFC/100mL.

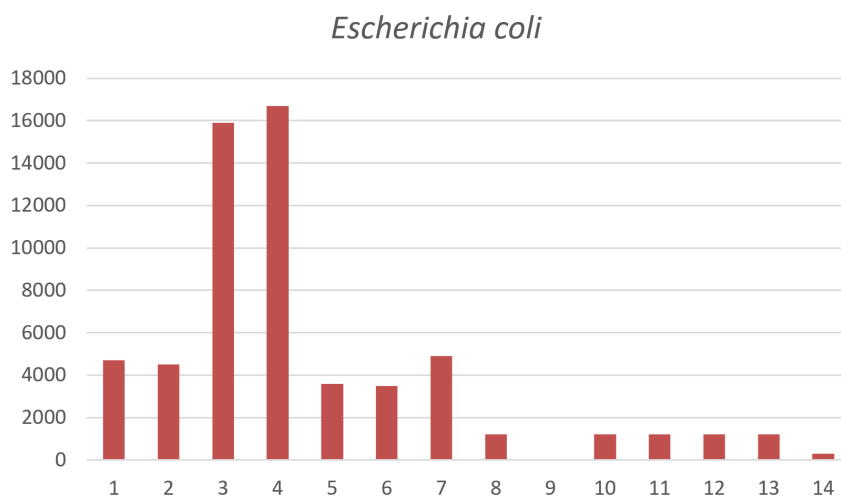
**Figura 1.** Recuento de Coliformes totales (UFC/100mL).



En los puntos 3 y 4 se encontraron los recuentos más altos de *Escherichia coli*. Estos puntos se localizan en la zona de Tres Esquinas. En la zona del parque industrial La

Cofradía los recuentos obtenidos no superaron las 1200 UFC/100mL (ver Figura 2). Al igual que para los coliformes totales, en el punto 9 no se recuperó *E. coli*.

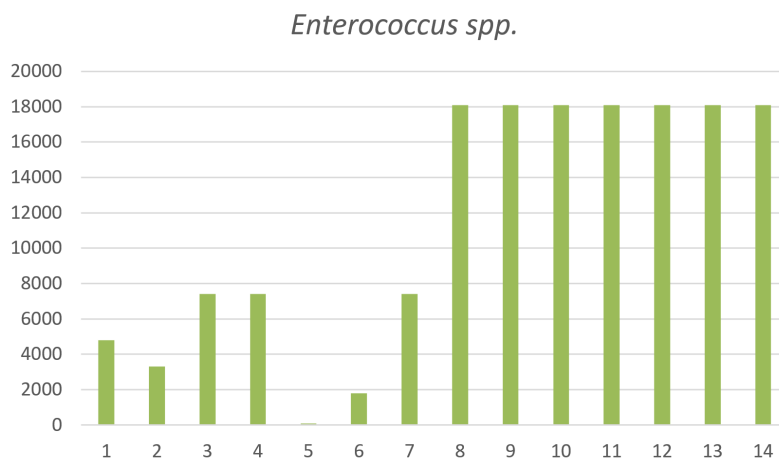
**Figura 2.** Recuento de *Escherichia coli* en UFC/100mL.



En el caso de *Enterococcus spp.*, en los puntos 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se presentaron los mayores recuentos, los puntos 3 y 4 están en la zona de Tres Esquinas y los demás en el parque industrial La Cofradía. Los recuentos variaron entre 100 y 18100

UFC/100mL. Este microorganismo se recuperó de todas las muestras recolectadas a diferencia de *Escherichia coli* y coliformes totales que no tuvieron crecimiento en el punto 9.

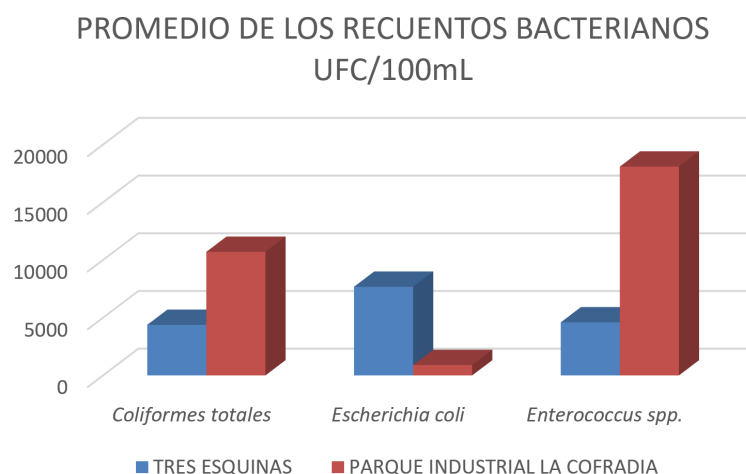
**Figura 3.** Recuento de *Enterococcus spp.* en UFC/100 mL.



En la Figura 4 se muestra el promedio de los indicadores y se comparan las dos zonas estudiadas. El promedio más alto corresponde a los *Enterococcus spp.* en la zona del parque industrial La Cofradía, seguido por

el de coliformes totales para la misma zona, mientras que para *E. coli* el promedio más alto fue obtenido en la zona de Tres Esquinas.

**Figura 4.** Promedio de los recuentos bacterianos por zonas.



Algunos de los microorganismos aislados que se identificaron mediante pruebas bioquímicas fueron: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*.

## Discusión

Los coliformes totales presentan un elevado recuento en la zona del parque industrial La Cofradía (a excepción del punto 9), comparados con los obtenidos en la zona de Tres Esquinas. Los altos niveles que se presentan en esta zona pueden deberse al aumento de asentamientos humanos, las actividades antrópicas, las descargas de escorrentía que se realizan por la vía Siberia (9) y la polución

que es eliminada al aire por el alto flujo de automóviles (10).

El origen de las bacterias coliformes puede ser fecal o ambiental (mediante insectos, plantas y suelo). Diversos factores ecológicos influyen en su permanencia y sobrevivencia, estas bacterias están adaptadas para vivir en el tracto gastrointestinal, aunque pueden sobrevivir en el agua residual y cuerpos acuáticos (11).

Los altos valores de coliformes totales indican que hay una fuente rica de nutrientes que hace posible que esta comunidad bacteriana esté presente en el cuerpo de agua, posiblemente relacionada a los desagües que llegan al humedal (12).

*Escherichia coli* presentó recuentos elevados en la zona de Tres Esquinas, a diferencia de la zona del parque industrial La Cofradía en donde los recuentos no superaron los 1200 UFC/100mL. Chalarca D, Mejía R, Aguirre N. reportan, para la ciénaga de Ayapel, recuentos elevados de *Escherichia coli* en todos los puntos de muestreo localizados cerca al casco urbano del municipio (13). Estos resultados son similares a los hallados en el humedal Gualí, donde la zona de Tres Esquinas es en la que se presenta un mayor asentamiento de viviendas.

En el punto 9 no se evidenció crecimiento de *E. coli* a pesar de que se presentaron recuentos de coliformes totales altos. Este fenómeno puede deberse a la menor resistencia de la *Escherichia coli* a las condiciones medio ambientales, ya que sufren estrés fisiológico, y por esta razón, pierden progresivamente la capacidad de desarrollarse en medios selectivos y diferenciales. Diferentes factores ambientales como la temperatura, la luz solar, la presencia de otras comunidades bacterianas y la composición química del agua repercuten directamente en la mortalidad de estas bacterias intestinales (14).

Los *Enterococcus spp.*, presentan mayores recuentos en los puntos correspondientes a la zona del parque industrial La Cofradía, donde el recuento promedio fue de 18100 UFC/100mL. Varios estudios han reportado que el aumento de este indicador está relacionado con una fuerte descarga de residuos domésticos de la población y también

con la temporada de lluvias ya que generan un ambiente propicio para la reproducción de este microorganismo que tiene una gran capacidad de supervivencia a diferentes factores ambientales (3) (15).

Es importante destacar que *Enterococcus spp.* en recuentos superiores a 1000 UFC/mL, podrían estar fuertemente relacionados con un alto riesgo de enfermedad gastrointestinal (16), que cobra gran importancia a nivel de salud pública, debido a que el agua de este humedal se utiliza para riego de cultivos de hortalizas y frutales, como uchuvas y fresas (17).

El género de los enterococos fecales tiene mayor permanencia en ecosistemas terrestres contaminados y en ambientes acuáticos que *Escherichia coli*, ya que no se reproduce en el medio ambiente. Su presencia es de importancia cuando se conoce que existe contaminación fecal y no se manifiestan coliformes, casos en donde las descargas son discontinuas o más viejas, entonces mueren los coliformes totales y la *Escherichia coli* dándole permanencia a los enterococos (18). Estos microorganismos se relacionan con contaminación fecal de origen humano y animal. Se ha confirmado en diferentes análisis que la presencia de diversos animales afecta la calidad bacteriológica de las aguas(19-20).

En conclusión, en el humedal Gualí-Tres Esquinas la presencia de urbanizaciones, industrias, animales domésticos, el pastoreo y el uso del humedal como receptor de aguas

residuales ha deteriorado de manera significativa la calidad bacteriológica del agua, la zona del parque industrial La Cofradía fue la más contaminada, ya que tuvo recuentos altos para coliformes totales y *Enterococcus spp.*

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y sus autores manifiestan no tener conflicto de intereses.

A la Empresa Municipal de Acueducto, Alcantarillado y Aseo de Funza EMAAF, por su valioso aporte de información sobre el humedal producto de su experiencia y trabajo dedicado en la conservación de este importante recurso natural.

## Referencias

1. Revueltas Silva O, Córdoba Sánchez N. 2014. Evaluación ambiental del humedal las chozas en el área urbano-rural del municipio de Popayán. [Trabajo de grado]. Universidad de San Buenaventura.
2. Manual de la convención sobre los Humedales Ramsar. 2006. Cuarta edición. [http://www.ramsar.org/sites/default/files/documents/pdf/lib/lib\\_manual2006s.pdf](http://www.ramsar.org/sites/default/files/documents/pdf/lib/lib_manual2006s.pdf)
3. Rodríguez Cuitiva DE. 2012. Distribución de Enterococos como indicadores de contaminación fecal en aguas de la Bahía de Tumaco, Pacífico colombiano. Rev cubana Hig Epidemiol. 50(2). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S156130032012000200002&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S156130032012000200002&script=sci_arttext&tlng=pt)
4. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca - CAR. 2011. Humedales del Territorio CAR. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca - CAR. (2014b).
5. Corporación Autónoma regional de Cundinamarca -CAR. 2013. Fundación para la conservación del patrimonio natural - biocolombia, convenio no. 149-03. <http://oab.ambientebogota.gov.co/es/con-la-comunidad/02/fundacion-para-la-conservacion-del-patrimonio-natural-biocolombia>
6. DECRETO 475 DE 1998, por el cual se expiden normas técnicas de calidad del agua potable. Ministerio de Salud de Colombia. [http://www.emcali.com.co/documents/10157/37675/\(11\)%20Decreto++475+de+1998.pdf](http://www.emcali.com.co/documents/10157/37675/(11)%20Decreto++475+de+1998.pdf).
7. Andreu Moliner E. Camacho González A. 2003. Recomendaciones Para la Toma de Muestras de Agua, Biota y Sedimentos en Humedales Ramsar. Madrid. Dirección General de Conservación de la Naturaleza.
8. Lipps W. 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition.
9. Suárez López J. 2014. La contaminación de las escorrientías de autopistas como presión significativa sobre las masas de agua. Congreso Nacional De Medio Ambiente 2014. [www.conama2014.org](http://www.conama2014.org)
10. Rojas Y, Jordán M, Yegres F, Araujo J. 2013. Caracterización microbiológica del suelo, agua y aire en el humedal Quebrada de Guaraná, Paraguaná, estado Falcón. Revista de la Universidad de Zulia. 4 (9). <http://produccioncientificaluz.org/index.php/ruluz/article/view/19671/19626>.
11. Barrera-Escorcia G, Fernández-Rendón CL, Wong-Chang I, Ramírez Romero P. 2013. La sensibilidad del grupo coliforme como indicador de la presencia de enterobacterias, patógenas en cuatro cuerpos acuáticos de México. Hidrobiológica 2013, 23 (1): 87-96
12. Rodríguez R, Retamozo-Chavez R, Aponte H, Valdivia E. 2017. Evaluación microbiológica de un

- cuerpo de agua del ACR humedales de Ventanilla (Callao, Perú) y su importancia para la salud pública local. *Ecología Aplicada*. 16(1). DOI: <http://dx.doi.org/10.21704/rea.v16i1.899>
13. Chalarca Rodríguez D, Mejía Ruiz R, Aguirre Ramírez N. 2007. Aproximación a la determinación del impacto de los vertimientos de las aguas residuales domésticas del municipio de Ayapel, sobre la calidad del agua de la ciénaga. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*. 40. pág. 41-58. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012062302007000200003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012062302007000200003&script=sci_arttext).
  14. Benítez Rodas GA. 2013. Análisis y modelización de la inactivación de *Escherichia coli* en aguas residuales. <https://eprints.ucm.es/22907/1/T34742.pdf>
  15. López Pérez L, Gómez D'Angelo Y, Beltrán González J, Alvarez Valiente J. 2013. Indicadores bacteriológicos de contaminación fecal en la Bahía de la Habana. *Revista Gestión y Ambiente*. 16. (2). <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/gestion/article/view/39564/4203>
  16. Campos-Pinilla, Cárdenas-Guzmán M, Guerrero-Cañizares A. 2008. Comportamiento de los indicadores de contaminación fecal en diferente tipo de aguas de la sabana de Bogotá (Colombia). *Universitas Scientiarum*. 13 (2), pp. 103-108
  17. Molina Vergel D. 2015. Análisis sobre valoración económica de los servicios ambientales del humedal el Gualí-Tres Esquinas del municipio de Mosquera, Cundinamarca. 9(2), 68–70.
  18. Ríos-Tobón S, Agudelo-Cadavid RM, Gutiérrez-Builes LA. 2017. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*. 35 (2).
  19. Namihira-Santillán P, Barrera-Escorcía G, Márquez-García A. 2002. Contaminación por bacterias fecales en el Lago Huayamilpas, México D.F. *Hidrobiológica*. 12 (2): 129- 136. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57812205>.
  20. Sara Lilia, Ávila, Estupiñán Torres, S., Lina Marcela, C., Calderón Cárdenas, X., & Rubiano Aguirre, W. (2019). Diagnóstico de la calidad bacteriológica del agua del Humedal Córdoba, Bogotá. *NOVA*, 17(31), 87-95. Recuperado a partir de <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/946>



## Políticas del editorial

### *Enfoque y alcance.*

NOVA es una publicación científica de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca (Colombia), cuyo fin primordial consiste en la difusión de trabajos originales que contribuyen a ampliar los conocimientos en las ciencias biomédicas. Todo material propuesto para publicación en NOVA es revisado por el Comité Editorial y enviado para evaluación externa a dos evaluadores o pares científicos. El editor informa a los autores sobre la recepción de los trabajos, sobre los comentarios de los evaluadores y sobre la decisión final que se tome para su publicación. La revista NOVA se reserva el derecho de aceptar o rechazar los artículos y podrá hacer sugerencias o cambios que tiendan a mejorar su presentación.

Los originales de los artículos permanecerán en los archivos de la revista hasta por un año. El autor principal recibirá, libre de costo, 3 ejemplares de la revista.

NOVA – Publicación Científica en Ciencias Biomédicas está Indexada en: Índice Latinoamericano – LILACS, de la Plataforma BIREME; Índice Mexicano de Revistas Biomédicas Latinoamericanas -IMBIOMED; Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal – REDALYC; Base de Datos de Revistas Accesibles en Formato Electrónico -FARO de la Universidad y EBSCO Information Services.

### *Proceso de revisión por pares.*

El proceso de evaluación de un manuscrito consta de una preselección y revisión general por el comité editorial seguida de una evaluación doble ciega solicitada a pares especialistas en la materia. Una vez realizada la evaluación por parte del par académico, los autores recibirán el concepto de Aprobado, Aprobado con modificaciones menores, Aprobado con modificaciones mayores ó No aprobado. En aquellos casos en que el manuscrito sea aprobado con modificaciones el autor recibirá también las sugerencias y comentarios realizados por los evaluadores. Los autores contarán máximo con un mes de plazo a partir de la entrega de las evaluaciones, para hacer los ajustes del caso y enviar la versión corregida del manuscrito de nuevo al editor de la revista, acompañada de una carta explicativa

detallada de los ajustes incorporados. El comité editorial verificará la incorporación de los cambios al manuscrito y si lo considera pertinente la enviará de nuevo al par evaluador para su concepto. La decisión final sobre la publicación del manuscrito estará sujeta a la conformidad del par académico y del comité editorial con respecto a la inclusión de las modificaciones solicitadas al autor. En caso de ser aceptado el manuscrito para publicación los autores deberán firmar una declaración de originalidad y una autorización de los derechos de publicación y reproducción del mismo y de la inclusión en bases de datos, páginas web, o páginas electrónicas, nacionales o internacionales.

### *Frecuencia de publicación.*

La Revista NOVA es publicada dos veces al año a partir del 2005.

### *Política de acceso abierto.*

Esta revista proporciona un acceso abierto a su contenido, basado en el principio de que ofrecer al público un acceso libre a las investigaciones ayuda a un mayor intercambio global del conocimiento.

### *Directrices para autores/as*

La revista NOVA, que es una publicación de acceso abierto sin ningún tipo de costo para someter y visualizar artículos, publicará las siguientes categorías de trabajos:

**Artículo original:** es un trabajo inédito derivado de una investigación biomédica que aporta información nueva sobre aspectos específicos y contribuye de manera relevante al conocimiento científico. La estructura generalmente utilizada contiene cuatro apartes importantes: introducción, metodología, resultados y discusión.

**Artículo de revisión:** Estudio y análisis crítico de la literatura reciente y pertinente a un tópico especial más los puntos de vista del autor al tema (de modo impersonal). Consiste en un «estado del arte» del tema propuesto, e incluye dos categorías de manuscritos:

- A. solicitado directamente por el Comité Editorial a personas expertas en el tema,
- B. ofrecido por profesionales interesados en un tópico particular, caso en el cual deben observar las siguientes recomendaciones:

- i) Enviar carta de solicitud en la que se indique por qué el tema escogido es pertinente para los lectores de Nova;
- ii) Proporcionar una breve descripción de los apartes que serían cubiertos, así como algunas referencias claves; además, indicar su probable extensión y el número aproximado de ilustraciones;
- iii) Si la revisión se acepta para enviarla a evaluación, debe incluir, preferiblemente, un resumen con énfasis en el significado de los hallazgos recientes, una corta introducción al tema, señalando hitos pasados y desarrollos presentes, así como otros encabezamientos en el texto, con el objeto de hacer más provechosa su lectura. El desarrollo del tema queda a discreción del autor pero se aconseja que incluya tablas y figuras que hagan ágil el texto y ofrezcan una comprensión más rápida de su contenido.

**Guía académica:** es un trabajo enmarcado dentro de los procesos de investigación formativa, proyección social y/o procesos pedagógicos de interés para la comunidad universitaria desarrollados en las instituciones de educación superior, sobre un tema específico, con la participación de docentes y estudiantes.

**Comunicación breve:** es el informe de resultados parciales o finales de una investigación cuya divulgación rápida es de importancia. Nota: es un trabajo de 1.000 palabras máximo, con un número de figuras y tablas no mayor de 2 y cuyo resumen no debe pasar de 100 palabras. Los métodos, resultados y discusión se presentan agrupados en una única sección.

**Nota técnica:** es un escrito breve, en el que se describe en detalle una técnica de laboratorio novedosa o modificaciones realizadas a una técnica ya establecida, enfatizando las ventajas que tiene el procedimiento o la innovación desarrollados.

**Ensayo:** es un escrito breve, filosófico, literario o científico, que presenta la opinión sustentada del autor sobre un tema específico.

**Cartas al editor:** los lectores solicitan aclaraciones o presentan comentarios sobre cualquier material publicado en la revista. Así como posiciones críticas analíticas o interpretativas sobre los documentos publicados en la revista, que a juicio del Comité editorial constituyen un aporte importante a la discusión del tema por parte de la comunidad científica de referencia.

**Comentarios bibliográficos:** son escritos breves, críticos, sobre libros de biomedicina.

## *Preparación del manuscrito*

Cíñase a las indicaciones publicadas por el International Committee of Medical Journal Editors, uniform requirements for Manuscripts submitted to biomedical journals. *J pharmacol pharmacother.* 2010; 1(1): 42-58 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3142758/>)

La versión en castellano se puede consultar en la revista *Acta Médica Colombiana* (*Acta Med Colomb* 1997; 22:199-211) o en <http://www.actamedica.es/>. Cada una de las secciones del manuscrito debe aparecer en una nueva página en el siguiente orden: portadilla, resumen, texto, agradecimientos, referencias, cuadros, pies de figuras y tablas.

**Portadilla:** además del título del trabajo y del título corto para los encabezamientos de las páginas, debe contener los nombres completos de los autores, su afiliación institucional y el nombre de la institución en donde se llevó a cabo el trabajo. También se debe anotar el nombre del autor responsable de la correspondencia con su dirección completa, número telefónico, fax y dirección electrónica.

**Resúmenes y palabras clave:** el trabajo debe tener resumen en español y en inglés, cada uno de 250 palabras como máximo. Evite el uso de referencias en los resúmenes. Para la sección de las 6 palabras claves en español, consulte los descriptores de Ciencias de la Salud (DeCS) del Índice de Literatura Latinoamericana y del Caribe en Ciencias de la Salud (LILACS) en la última versión publicada en disco compacto o en <http://decs.bvs.br/>; para la sección de las 6 palabras clave en inglés, consulte los Medical Subject Headings (MeSH) del Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>).

**Texto:** todo el documento, incluso la página del título, los resúmenes, las referencias, los cuadros y los pies de figuras, debe estar escrito a doble espacio, por un solo lado de la hoja, sin dejar espacios extras entre párrafo y párrafo; deje un solo espacio después del punto seguido o aparte. Use la fuente Arial de tamaño 12 puntos y no justifique el texto. Use letra bastardilla o itálica para los términos científicos; por favor, no los subraye. Formato electrónico: envíe medio electrónico del documento en procesador de palabra MS Word, para PC. Incluya las gráficas en formato TIFF o JPG a 300 DPI como mínimo. La fuente preferida para las gráficas es Arial Narrow. Si sus archivos provienen de un computador Apple – Macintosh, conviértalos a plataforma PC. Incluya una lista de los archivos enviados y el programa en que fueron desarrollados.

Los artículos originales deben contener 7 partes básicas, así:

1. *Título (en español e inglés). El título en mayúsculas, preciso y sin abreviaturas. Los nombres científicos en latín y en bastardilla. Apellidos y nombres del o de los autores, institución, dirección postal completa, número de fax y correo electrónico del autor responsable para la correspondencia y fecha de envío.*
2. *Resumen (español e inglés). De no más de 250 palabras en español e inglés, debe enunciar las propuestas de la investigación, los procedimientos básicos, los resultados principales y las conclusiones. Se requiere suministrar entre 6 y 10 palabras claves.*
3. *Introducción. Distribuir el contenido según la conveniencia del tema, con subtítulos o apartes.*
4. *Materiales y métodos.*
5. *Resultados.*
6. *Discusión.*
7. *Referencias.*

### ***Agradecimientos:***

Dirigidos a personas con aportes que no justifican acreditación como autor, por ayuda técnica recibida, por tipo de apoyo material y financiero.

### ***Referencias:***

- Asíguele un número a cada referencia citada, en orden ascendente, incluyendo las del texto, los cuadros y las figuras. Anote los números de las referencias entre paréntesis y no como índice ni subíndice.
- Cuando hay más de una cita, éstas deben separarse mediante comas, pero si fueran correlativas, se menciona la primera y la última separadas por un guión.
- Cuando en el texto se menciona un autor, el número de la referencia se pone tras el nombre del autor. Si se tratase de un trabajo realizado por más de dos autores, se cita el primero de ellos seguido de la abreviatura “et al” y su número de referencia.

#### **1. Artículo estándar.**

Autor/es\*. Título del artículo. Abreviatura\*\* internacional de la revista. año; (volumen número): página inicial-final del artículo.

Kolovou G, Daskalova D, Mikhailidis DP. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Angiology*. 2003;54(2): 59-71.

\* Si los autores fueran más de seis, se mencionan los seis primeros seguidos de la abreviatura et al.

\*\* Las abreviaturas internacionales pueden consultarse en “Journals Database” de PubMed. Las españolas en el Catálogo C17 (<http://www.c17.net/>) ó bien en el DREV (<http://bvshalud.isciii.es/php/index.php>) de la BVS del Instituto de Salud Carlos III y en la base de datos de Revistas de Biomedicina del IHCD de Valencia. ([https://bddoc.csic.es:8180/inicioBuscarSimple.html?estado\\_formulario=show&bd=IME&tabla=revi](https://bddoc.csic.es:8180/inicioBuscarSimple.html?estado_formulario=show&bd=IME&tabla=revi)).

### **1.1 Incorporación opcional de número de identificación único de bases de datos en la referencia:**

La mayoría de bases de datos o documentos electrónicos incorpora un número de identificación unívoco en cada referencia (PubMed: PMID; Cochrane Library:CD; DOI), que pueden incorporarse a la referencia bibliográfica para su perfecta identificación.

López-Palop R, Moreu J, Fernández-Vázquez F, Hernández Antolín R; Working Group on Cardiac Catheterization and Interventional Cardiology of the Spanish Society of Cardiology. Registro Español de Hemodinámica y Cardiología Intervencionista. XIII. Informe Oficial de la Sección de Hemodinámica y Cardiología Intervencionista de la Sociedad Española de Cardiología (1990-2003). *Rev Esp Cardiol.* 2004; 57(11): 1076-89. Citado en PubMed PMID 15544757.

The Cochrane Database of Systematic Reviews 1998, Issue 3 [base de datos en Internet]. Oxford: Update Software Ltd; 1998- [consultado 28 de diciembre de 2005]. Wilt T, Mac Donald R, Ishani A, Rutks I, Stark G. Cernilton for benign prostatic hyperplasia. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD001042.pub2/abstract> ó <http://www.update-software.com/clibplus/clibplus.asp>. Citado en Cochrane Library CD001042.

### **1.2 Organización o equipo como autor**

Grupo de Trabajo de la SEPAR. Normativa sobre el manejo de la hepnotosis amenazante. *Arch Bronconeumol* 1997; 33: 31-40.

## **2. Libros**

Autor/es. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial; año.

Jiménez L, Montero FJ. Compendio de Medicina de Urgencias: guía terapéutica. 2ª ed. Madrid: Elsevier; 2005.



*Nota: La primera edición no es necesario consignarla. La edición siempre se escribe en números arábigos y abreviatura: 2ª ed. Si la obra estuviera compuesta por más de un volumen, citarlo a continuación del título del libro.*

## **2.1 Organización como autor**

Comunidad de Madrid. Plan de Salud Mental de la Comunidad de Madrid 2003-2008. Madrid: Comunidad de Madrid, Consejería de Sanidad; 2002.

## **2.2 Capítulo de libro**

Autor/es del capítulo. Título del capítulo. En\*: Director/Coordinador/Editor del libro. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial; año. página inicial-final del capítulo.

Mehta SJ. Dolor abdominal. En: Friedman HH, editor. Manual de Diagnóstico Médico. 5ª ed. Barcelona: Masson; 2004. p.183-90.

## **3. Comunicación presentada a un congreso**

Autor/es de la ponencia. Título de ponencia. En: Título oficial del Congreso. Lugar de Publicación: Editorial; año. página inicial-final de la comunicación/ponencia.

Castro A, Escudero J. El Área del Corazón del Complejo Hospitalario “Juan Canalejo”. En: Libro de Ponencias: V Jornadas de Gestión y Evaluación de Costes Sanitarios. Bilbao; Ministerio de Sanidad y Consumo, Gobierno Vasco; 2000.p. 12-22.

*Nota: Esta misma estructura se aplica a Jornadas, Simposios, Reuniones Científicas etc.*

## **4. Informe científico o técnico**

Autor/es. Título del informe. Lugar de publicación: Organismos/Agencia editora; año. Número o serie identificativa del informe.

Organización Mundial de la Salud. Factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares: nuevas esferas de investigación. Informe de un Grupo Científico de la OMS. Ginebra: OMS; 1994. Serie de Informes Técnicos: 841.

## **5. Tesis Doctoral**

Autor. Título de la tesis [tesis doctoral]\*. Lugar de publicación: Editorial; año.

Muñiz J. Estudio transversal de los factores de riesgo cardiovascular en población infantil del medio rural gallego [tesis doctoral]. Santiago: Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidad de Santiago; 1996.

## **6. Patente**

Joshi R, Strebel HP, inventores; Fumapharm AG, titular. Utilización de derivados de ácido fumárico en la medicina de trasplante. Patente Europea. ES 2195609T3. BOPI 1-12-2003.

## **7. Artículo de revista en Internet**

Autor/es del artículo. Título del artículo. Nombre de la revista [revista en Internet]\* año [fecha de consulta]\*\*; volumen (número): [Extensión/páginas\*\*\*]. Dirección electrónica.

Francés I, Barandiarán M, Marcellán T, Moreno L. Estimulación psicocognoscitiva en las demencias. An Sist Sanit Navar [revista en Internet]\* 2003 septiembre-diciembre. [acceso 19 de octubre de 2005]; 26(3). Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272003000500007&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272003000500007&lng=en&nrm=iso&tlng=en).

\* Puede sustituirse por: [Revista on-line], [Internet], [Revista en línea]

\*\* [acceso...], [consultado...], [citado...]

\*\*\* Si constasen.

## **8. Base de datos en Internet**

Institución/Autor. Título [base de datos en Internet]. Lugar de publicación: Editor; Fecha de creación, [fecha de actualización; fecha de consulta]. Dirección electrónica.

PubMed [base de datos en Internet]. Bethesda: National Library of Medicine; 1966- [fecha de acceso 19 de diciembre de 2005]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>

Para otros tipos de referencias, no incluidas en los ejemplos, consultar:

**Cuadros y figuras:** elabore los cuadros usando la utilidad de tablas del procesador de palabras y no por columnas y tabulados en el texto mismo del manuscrito; envíe los nombres de los archivos. Para las figuras en blanco y negro, envíe el original y dos copias de la ilustración correspondiente acompañadas de su versión en medio magnético en formato tiff o jpg. a

300dpi. como mínimo de resolución y en un tamaño media carta. Gráficas desarrolladas en Excell, favor remitir el archivo original. Si son fotografías en blanco y negro, debe enviar tres copias de excelente calidad junto con la versión en medio magnético, en formato tiff o jpg a 300dpi como mínimo de resolución; si son transparencias, envíe la diapositiva original y no una copia, junto con dos impresiones en papel (fotocopia o escáner, adjuntando copia en medio magnético, formato tiff a 300dpi como mínimo de resolución) de la misma imagen para el envío a los evaluadores del manuscrito. En las preparaciones de microscopio, mencione la coloración y el aumento según el objetivo utilizado.

### *Lista preliminar para la preparación de envíos.*

Como parte del proceso de envíos, los autores/as están obligados a comprobar que su envío cumpla todos los elementos que se muestran a continuación. Se devolverán a los autores/as aquellos envíos que no cumplan estas directrices.

1. El envío no ha sido publicado previamente ni se ha sometido a consideración por ninguna otra revista (o se ha proporcionado una explicación al respecto en los Comentarios al editor/a).
2. El archivo de envío está en formato OpenOffice, Microsoft Word, RTF o WordPerfect.
3. Siempre que sea posible, se proporcionan direcciones URL para las referencias.
4. El texto tiene un interlineado sencillo, un tamaño fuente de 12 puntos, se utiliza cursiva en lugar de subrayado (excepto en las direcciones URL), y todas las ilustraciones, figuras y tablas se encuentran colocadas en los lugares del texto apropiados, en vez de al final.
5. El texto reúne las condiciones estilísticas y bibliográficas incluidas en Pautas para el autor/a, en Acerca de la revista.
6. En el caso de enviar el texto a la sección de evaluación por pares, se siguen las instrucciones incluidas en Asegurar una evaluación anónima.

### *Aviso de derechos de autor.*

NOVA por <http://www.unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova> se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional.

Así mismo, los autores mantienen sus derechos de propiedad intelectual sobre los artículos.

### *Declaración de privacidad.*

Los nombres y las direcciones de correo electrónico introducidos en esta revista se usarán exclusivamente para los fines establecidos en ella y no se proporcionarán a terceros o para su uso con otros fines.