



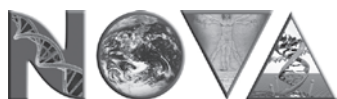
Publicación científica en ciencias naturales, biológicas y médicas

AÑO	VOLUMEN	NÚMERO	FECHA	EJEMPLARES	ISSN
19	19	37	julio - diciembre de 2021	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, Mediciatrina, Fuente Académica, IMBIOMED, Actualidad Iberoamericana e Index Copernicus.





**NOVA Publicación Científica  
en Ciencias Biomédicas**

Volúmen 19 Número 37

<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 Lucia 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. María Jesús 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

9

---

## Artículos de revisión / Review articles

### **Células asesinas naturales con el receptor de antígeno quimérico (CAR-NK): terapia emergente contra el cáncer**

11

Chimeric antigen receptor-natural killer cells: novel therapy against cancer

Vázquez Rodríguez Adrián BSc, Mendoza-Rincón Jorge Flavio BSc, MSc, PhD

### **El Deterioro Cognitivo como una complicación de la Diabetes Mellitus Tipo 2**

25

Cognitive Impairment as a Type 2 Diabetes Mellitus complication

Shadye Rocío Matar-Khalil, Fabio Camilo Rubio-Sandoval

---

## Artículos producto de la investigación / Articles product of the research

### **Enfermedades hematológicas y no hematológicas relacionadas con el fenotipo ABO en pacientes de una unidad hospitalaria de Medellín**

43

Hematological and non-hematological diseases related to the ABO phenotype in patients at a Medellín hospital unit

Villa Palacio María Isabel, Claudia María Cuervo Araque, Rodríguez Palacios Karime

### **Prevalencia de resistencia de bacteria aisladas en hemocultivos, en un hospital universitario de Colombia**

57

Prevalence of bacterial resistance isolated in hemocultures, in a university hospital of Colombia

Marlene Duran-Lengua, Luis Valladales-Restrepo, Roger Caraballo-Marimón, Geraldine Romero Martínez, Adrián Cabarcas-Tovar, Cristina Bohórquez Moreno

### **Uso de tecnologías de información y comunicación en el screening de la depresión asociada al consumo de sustancias psicoactivas**

71

Use of information and communication technologies in screening of depression associated with the use of psychoactive substances

Edith Villalobos Bolívar, Luis Gilberto Agreda López, Ángel Alberto Varón Quimbayo

**Evaluación de la calidad del agua de la vereda Río Suárez de  
Puente Nacional, Santander**

79

Water quality evaluation of the rural area of Río Suárez of Puente  
Nacional, Santander

Lucía Constanza Corrales Ramírez, Yurley Natalia Santamaria Mosquera,  
Dario Alberto Luccioli Peña, Miguel Angel Castañeda Casas

**Producción de astaxantina bajo factores de estrés utilizando un  
biorreactor a escala de laboratorio de 5 L**

99

Astaxanthin production under stress factors using a 5L laboratory  
scale bioreactor

Ana Graciela Lancheros Díaz, Luis Eduardo Díaz Barrera, Judith Elena Camacho Kurmen

**Actividad antimicrobiana *in vitro* de los vinos del Duero sobre  
cepas clínicas de *helicobacter pylori***

121

*In vitro* antimicrobial activity of Douro wines against clinical  
*helicobacter pylori* strains

Lidia Po Catalao Dionisio, Alejandro Manuel Labella, María Palma, Juan José Borrego



## Editorial

---

En esta edición de la Revista NOVA, nos complace presentar una selección de investigaciones innovadoras que abordan diversas áreas de la ciencia y la medicina. Nuestro objetivo es destacar los avances y descubrimientos más recientes que tienen el potencial de impactar positivamente en la salud y el bienestar de las personas.

En el campo de la inmunoterapia contra el cáncer, nos adentramos en la prometedora terapia con Células Asesinas Naturales con Receptor de Antígeno Quimérico (CAR-NK). Esta terapia emergente ha demostrado ser altamente eficaz en el reconocimiento y eliminación de tumores malignos, con la ventaja de evitar los efectos secundarios adversos asociados con las células CAR-T. Los estudios analizados sugieren que las CAR-NK pueden ser una alternativa más segura y asequible para un mayor número de pacientes.

Por otro lado, abordamos la conexión entre la Diabetes Mellitus Tipo 2 y el deterioro cognitivo. La revisión de literatura destaca la necesidad de una evaluación integral que incluya pruebas neuropsicológicas para prevenir el deterioro cognitivo en pacientes con diabetes, ya que se ha observado un aumento significativo en el riesgo de desarrollar demencia y Alzheimer.

En el ámbito de la salud hematológica, se investigó la relación entre el grupo sanguíneo ABO y ciertas enfermedades, tanto hematológicas como no hematológicas. Aunque no se estableció una correlación estadística entre los antígenos de grupo sanguíneo y el desarrollo de enfermedades específicas, los hallazgos clínicos sugieren ciertas tendencias que podrían abrir camino a futuras investigaciones.

En cuanto a las tecnologías de información y comunicación (TIC) en la salud, se presenta un software innovador para la identificación temprana de la depresión asociada al consumo de sustancias psicoactivas. Esta herramienta podría facilitar el diagnóstico y tratamiento oportuno de la depresión, mejorando así la calidad de vida de los pacientes.

Asimismo, abordamos la producción de astaxantina, un antioxidante importante, utilizando *Haematococcus pluvialis* en un biorreactor a escala de laboratorio. Los resultados sugieren que el estrés inducido en las microalgas puede aumentar significativamente la producción de astaxantina, lo que tiene implicaciones en la industria alimentaria y de suplementos.

Finalmente, exploramos la actividad antimicrobiana de los vinos de la región del Duero frente a la bacteria *Helicobacter pylori*, relacionada con enfermedades gastrointestinales. Los hallazgos resaltan el potencial del resveratrol como agente quimiopreventivo de la infección por *H. pylori*, lo que podría tener aplicaciones futuras en el tratamiento y prevención de enfermedades relacionadas.

En conjunto, estas investigaciones nos brindan una visión amplia y esperanzadora de los avances científicos y médicos actuales. En la Revista NOVA, continuaremos promoviendo la difusión de conocimientos y la exploración de nuevas fronteras en la ciencia para mejorar la salud y el bienestar de la sociedad.

Esperamos que disfruten de esta edición.

**Olga Lucía Ostos Ortiz<sup>1</sup>**

---

1. Editora Revista NOVA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6477-9872>

Google Scholar: <https://scholar.google.com/citations?user=yCBpLUAAAAJ&hl=es>

# Células asesinas naturales con el receptor de antígeno quimérico (CAR-NK): terapia emergente contra el cáncer

Chimeric antigen receptor-natural killer cells: novel therapy against cancer

Vázquez Rodríguez Adrián BSc<sup>1</sup>, Mendoza-Rincón Jorge Flavio BSc, MSc, PhD<sup>2</sup>

## Resumen

Una de las herramientas más novedosas en inmunoterapias adoptivas contra leucemias y tumores malignos es el uso del receptor de antígeno quimérico “CAR”. El receptor CAR ha sido ampliamente utilizada en células T (células CAR-T) potenciando su eficacia en el reconocimiento y eliminación de tumores, obteniéndose a la fecha terapias basadas en esta tecnología. No obstante, las células CAR-T llegan a repercutir negativamente en la salud del paciente, presentando el síndrome neurológico de efecto inmune asociado a células (ICANS) y el síndrome de lanzamiento de citocinas (SLC). Como consecuencia, el paciente necesita ser hospitalizado durante la terapia. Además, el coste de manufactura y terapia es elevado, siendo una tecnología limitada a un sector muy bajo de la población. En este trabajo, mencionamos el empleo de una terapia emergente de células asesinas naturales (NK) con el receptor CAR (CAR-NK), que cuentan con muchas ventajas por encima de las células CAR-T. Las células CAR-NK conservan su capacidad citotóxica en contra de tumores gracias a su acción dependiente de receptores activadores e inhibidores, por lo que el receptor CAR, solo estimula sus habilidades y persistencia. Sumado a esto, el coste de una terapia de células CAR-NK podría resultar redituable debido a la capacidad de las células CAR-NK de eliminar múltiples células tumorales sin generar daño colateral en el paciente. Aquí analizamos las características de los múltiples receptores CAR y los fenotipos de células NK que han sido utilizados durante múltiples ensayos (NK-92, células NK de sangre cordal y periférica, y células NK iPSC).

**Palabras claves:** inmunoterapia adoptiva, leucemias, tumores malignos, terapia de receptor antígeno quimérico, células t, terapia CAR-T, células NK.

1. Laboratorio 9, planta baja. Unidad de Investigación disciplinaria (UMIEZ). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. 09230.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7095-8156>

2. Laboratorio 9, planta baja. Unidad de Investigación disciplinaria (UMIEZ). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. 09230.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9467-617X>

Correo electrónico de correspondencia: [jflavio.m@gmail.com](mailto:jflavio.m@gmail.com)

## Abstract

One of the novel and effective devices against leukemia and solid tumors in adoptive immunotherapies is the use of the chimeric antigen receptor “CAR”. CAR technology has been widely used in T-cells (CAR-T cells) empowering its efficacy on the identification and elimination of tumor cells, getting today certain drugs based on this technology. Nevertheless, CAR-T cells can have a negative impact on patient health, causing in many cases immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome (ICANS) and cytokine release syndrome (CRS). As a consequence, the patient will have to be hospitalized for the duration of therapy. Moreover, the cost of manufacture and therapy is quite expensive, limiting its use to a low range of people. On the other hand, we analyze the advantages of Natural Killer cells with the CAR receptor (CAR-NK), which have many plusses over CAR-T cells. CAR-NK cells retain their cytotoxic abilities against tumor cells due their activator/inhibitor receptors balance. Thus, the CAR receptor technology just increases their skills and persistence. Furthermore, CAR-NK therapy could be more profitable since CAR-NK can eliminate multiple tumor cells without generating collateral damage on patient health. Here, we discuss the characteristics of the multiples CAR receptors in general and the NK types cells that have been used in trials demonstrating their viable emerging therapy (NK-92, cord and peripheral blood NK cells, and iPSC-derived NK cells).

**Keywords:** immunotherapies, adoptive, leukemia, solid tumors, chimeric antigen receptors, CAR-T therapy, NK cells.

## Introducción

El uso del receptor quimérico de antígeno (CAR por sus siglas en inglés) en células T, ha proporcionado al área de la inmunología un nuevo enfoque en el tratamiento contra el cáncer. Esto a partir de células T modificadas que son capaces de reconocer el antígeno CD-19 de las células B en linfomas malignos, o en neutralizar directamente otra célula cancerígena mediante otros estímulos (1,2). El uso de las células CAR-T ha obtenido exitosos resultados, sin embargo, los efectos negativos también son igual de importantes

de destacar, siendo probablemente las células CAR-T más perjudiciales que beneficiosas. Esto es debido a capacidad de ocasionar el síndrome neurológico de efecto inmune asociado a células (ICANS, por sus siglas en inglés) y el síndrome del lanzamiento de citocinas o “tormenta de citocinas” (SLC) (1,2). La importancia inmunológica de las células CAR-NK (CAR-Natural Killer) radica en los beneficios de su uso terapéutico en el cáncer, debido a las ventajas sobre otros tipos de células CAR, como las células CAR-T. Las células CAR-NK retienen su habilidad citotóxica innata

además de poder detectar células tumorales MHC-negativas (Complejo Principal de Histocompatibilidad negativas), contrario a las células CAR-T dependientes en mayor grado de la expresión de antígenos tumorales mediante el MHC (3). Por lo tanto, una desregulación en la expresión del MHC por parte de las células tumorales reducirá significativamente la eficacia de las CAR-T (4). Entre las capacidades de las células CAR-NK se encuentra que estas pueden atacar de manera espontánea a las células, ya que las células CAR-NK, además de producir citocinas, pueden producir INF- $\gamma$  (Interferón gamma), IL-3 (Interleucina 3) y factores de estimulación para poblaciones de granulocitos y macrófagos (5). Por último, las células CAR-NK pueden atacar y eliminar varias células blanco sin perder sus efectos, llegando a reducir posiblemente el número de células NK necesarias en este tipo de terapias (5,6). Habiéndose mencionado los beneficios de las células CAR-NK, el presente ensayo busca proporcionar información más a fondo de las características del receptor CAR, de las células CAR-NK y mostrar puntos clave de su uso en el campo de la inmunovigilancia oncológica.

### **Receptor CAR y sus características**

El receptor quimérico de antígeno o *chimeric antigen receptor (CAR)* son un conjunto de receptores de antígeno en los cuales, una sola molécula puede redireccionar las

funciones y especificidad de las células inmunes como lo son las células T o las células NK (4). El enfoque principal al que se ha dirigido el uso del receptor CAR es para la terapia contra el cáncer, generando en las células cancerígenas un blanco para su posterior ataque de células inmunes que expresan dicho receptor, modificando sus herramientas cinéticas y de inmunización activa. Una vez expresado el receptor CAR, las células inmunes adquieren funciones suprafisiológicas y actúan como una “droga viviente” que puede ejecutar efectos inmediatos o a largo plazo en la terapia (5,6).

El funcionamiento del receptor CAR en las células inmunes innatas (células NK) y en las células inmunes adaptativas (células T) requiere un control en la transducción para la correcta expresión del receptor y una capacidad de expansión clonal de la célula modificada para que la progenie de dicha célula pueda ejecutar las mismas funciones. La transducción se puede lograr mediante múltiples procedimientos, sin embargo, se necesita una transferencia genética estable para que las células modificadas puedan clonar y expresar el receptor CAR de una manera adecuada (3,5).

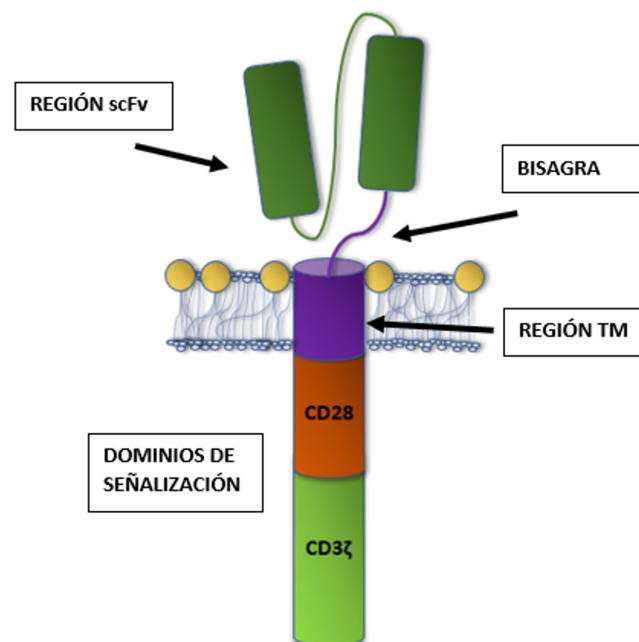
Contrario a los receptores que comúnmente podemos encontrar en las células inmunes los cuales solo pueden unirse a un ligando específico expresado en la célula blanco, las células CAR pueden unirse a una variedad de ligandos blanco, dándoles una capacidad quimérica. Por ejemplo, el receptor TCR de las células T (T-Cell Receptor) solo es

capaz de unirse a péptidos que hayan sido expresados gracias a la molécula HLA del Complejo Principal de Histocompatibilidad en la membrana celular, lo que limita la actividad del receptor TCR a un espectro en el holotipo de cada paciente (5). No obstante, si observamos una célula CAR-T, esta será capaz de anclarse a moléculas que no necesariamente hayan sido procesadas por HLA y, además, no depende tanto de la cantidad de expresión de moléculas de HLA como lo hace el receptor TCR, ya que las CAR-T son capaces de reconocer una célula tumoral, aunque tenga una baja expresión

de moléculas de HLA, lo cual es una forma conocida de evasión inmunológica por parte de las células cancerígenas (1,3).

La construcción de un receptor CAR tiene cuatro componentes indispensables, que a lo largo del tiempo han sido modificados. El primero es una cadena simple de fragmento variable (scFv) derivada de anticuerpos, le sigue una bisagra, un dominio transmembranal (TM) y finalmente, uno o varios dominios de señalización intracelular (Figura 1) (4, 5).

**Figura 1.** Componentes de un receptor CAR. Cada uno de los componentes ha sido estudiado y optimizado a lo largo del tiempo para maximizar la detección de tumores, la activación de la célula inmune y la eliminación cancerígena. La región scFv que le confiere al receptor CAR su especificidad consta de una cadena variable pesada (VH) y una ligera (VL) unidos con una liga flexible. El tamaño y el orden de las cadenas variables, junto con la distancia que los separa afecta la afinidad de la unión al antígeno. La bisagra es importante para la sinapsis inmunológica, una bisagra larga proporciona más flexibilidad para alcanzar antígenos cercanos a la membrana diana, mientras que una corta es suficiente para antígenos un poco más distales. El dominio transmembranal (TM) consiste en una alfa-hélice hidrofóbica la cual ancla el constructo a la célula. La optimización de las células CAR se enfoca un poco más en la modificación del último de los componentes del receptor CAR, los dominios de señalización intracelulares.



Fuente: Elaboración propia.



Los métodos utilizados para la unión del receptor CAR con el antígeno se engloban en 3 categorías principales: 1) La unión a través de la cadena scFv derivada de un anticuerpo; 2) Unión con fragmentos de la región Fab; y 3) La unión de ligandos hermanos. Las cadenas svFv derivadas de inmunoglobulinas de murinos son frecuentemente utilizadas, pero necesitan ser más específicas para cada paciente como lo son las regiones Fabs de la Ig humana ya que pueden ser reconocidas por el sistema inmune como extrañas (6).

Las secuencias de eventos en la unión del receptor con el antígeno aún no son del todo claras. Se piensa que la posición del epítipo y la distancia hacia la superficie de la célula afecta la unión con el antígeno. Observaciones empíricas indican que la región “espaciada” entre la cadena scFv y la membrana celular afectan la especificidad del receptor CAR. También es probable que la longitud del receptor CAR y la protrusión de la membrana del linfocito, también afecten la eficacia del receptor, sin embargo la evidencia que sustente estas ideas aún es poca (6,7).

### ***Historia detrás del receptor quimérico de antígeno (CAR)***

En 1986, Steven Rosenberg aprovechó el potencial del uso de células T en terapias con pacientes que presentaban melanomas, iniciando un nuevo capítulo en la historia del tratamiento contra el cáncer. Mientras

que el proceso de aprovechamiento de la técnica de infiltración tumoral de linfocitos (TIL) tiene bastantes complicaciones, el uso de la ingeniería en los receptores de células T (TCR) confiere una especificidad entre el tipo de cáncer, lo que se denominan receptores CAR (5). Aunque anteriormente las terapias con receptores CAR eran específicas para cada paciente debido a la unión con HLA, la adición de dominios estimulatorios ha permitido la mejora en el potencial del receptor CAR, dando el salto hacia receptores CAR de segunda, tercera y cuarta generación, estos últimos son los que especialmente han sido modificados para ser más funcionales, aumentando la capacidad citotóxica y proliferativa de las células inmunes (4,5).

Otro nombre por el cual son conocidos algunos de los receptores CAR de cuarta generación son “armored CARs” o TRUCKS (T cells redirected for Universal Cytokine Killing), los cuales están mejorados para acentuar las capacidades antitumorales, la proliferación y persistencia de las células CAR-T, este constructo novedoso está diseñado para atacar tumores sólidos mediante una “carga útil” que facilita la proliferación y persistencia de la células CAR-T y modula el microambiente tumoral, expresando también otro producto, la IL-12, que facilita la liberación de la carga útil (Tabla 1) (8). Sin embargo, estas células CAR y demás de la cuarta generación por lo regular, generan toxicidad no anticipada debido a su excesiva capacidad citotóxica (9,10).

**Tabla 1.** Cambios generacionales en el receptor CAR y sus características: Las modificaciones realizadas en los receptores CAR hace que se dividan en 4 generaciones, cada una con características únicas. Démonos cuenta de que esto conduce al afán de continuar la investigación de este recurso novedoso y funcional.

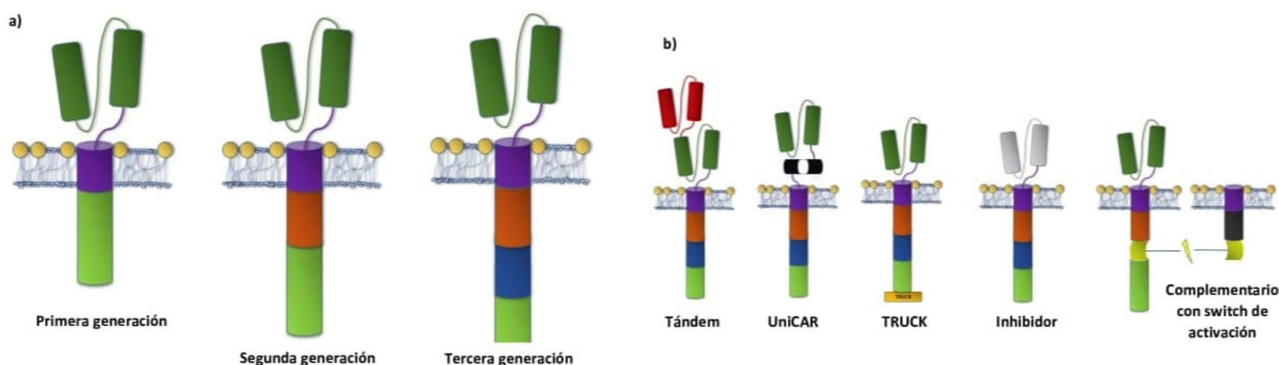
GENERACIÓN DEL RECEPTOR CAR	CARACTERÍSTICAS
Primera generación.	Poseen un solo dominio de activación llamado CD3 $\zeta$ .
Segunda generación.	Tienen un único dominio transmembranal coestimulador, junto con el dominio de activación CD3 $\zeta$ .
Tercera generación.	Cuentan con dos o más dominios transmembranales coestimuladores junto con el dominio de activación CD3 $\zeta$ .
Cuarta generación (armored CARs o TRUCKS).	Apuntan en mejorar la citotoxicidad y permanencia de las células T o NK.

Fuente: Elaboración propia.

La evolución de la construcción de receptores CAR se ha centrado principalmente en optimizar los dominios de señalización intracelular. Los receptores CAR de primera generación en células T contenían únicamente los dominios de activación CD3 $\zeta$ , mientras que los receptores de segunda y tercera generación cuentan con uno y dos dominios coestimuladores respectivamente. Los más utilizados a la fecha son los del do-

minio de la familia CD28 (observado en la Figura 1) como los de la familia del receptor TNF (4-1BB, OX40 y CD27) (11,12, 13,14). La elección de estos dominios coestimuladores permite un ajuste más fino de la respuesta deseada de las células inmunes, por ejemplo, las CAR T con dominio CD28 exhiben una capacidad citolítica aumentada (ver Figura 2) y (4).

**Figura 2.** a) Receptores CAR de primera, segunda y tercera. b) receptores de cuarta generación. La modificación de todas las regiones apunta a receptores CAR de cuarta generación más eficientes. Por ejemplo, el receptor tándem está diseñado para unirse a dos diferentes blancos, el cual está unido a un único dominio TM. El receptor UniCAR, está especializado en unirse distintos tipos de blancos tumorales, realizándose en él una breve modificación genética previa a la administración de la terapia de acuerdo con el cáncer del paciente, este tipo de receptor ya ha sido utilizado en células CAR-NK. El receptor TRUCK recibe el nombre debido a que posee una carga útil que facilita la eficacia de la célula CAR en general. De manera similar, el receptor inhibidor se enfoca en pasar de un estado inhibidor a uno activador a distintos blancos de los puntos de control inmunológico, como PD-1 o CTLA-4. Finalmente, el receptor con switch de activación efectúa su actividad únicamente cuando ha sido estimulado con algún medicamento.



Fuente: Elaboración propia.

Los tratamientos clínicos exitosos son los de las células CAR-T de segunda generación denominada *CD19-targeted CAR-T* resultaron en la aprobación de la FDA de los Estados Unidos (Food and Drug Administration) de dos productos denominados Kymriah® (Novartis) y Yescarta® (Kite/Gilead) respectivamente. Desafortunadamente, las desventajas del uso de células CAR-T superaban las ventajas que proporcionaban, entre los que se encuentran su tiempo y su costo de manufactura y su toxicidad severa que puede desencadenar neurotoxicidad con el síndrome neurológico de efecto inmune asociado a células (ICANS) y toxicidad en

el organismo en general por el síndrome de lanzamiento de citocinas (CRS), donde se observan grandes niveles de citocinas como IL-6, INF- $\gamma$  y el factor estimulante de colonias de monocitos-macrófagos (GM-CSF). Por lo regular, la toxicidad generada por las células CAR-T usualmente requiere que los pacientes sean hospitalizados por tres semanas (Tabla 2) (15, 16, 17).

Una estrategia alternativa para mitigar los efectos negativos en la terapia basada en células CAR-T es la utilización de células Natural Killer (3,4).

**Tabla 2.** Efectos adversos en la salud y bienestar de los pacientes bajo las terapias de CAR-T. Estos efectos adversos conducen a la utilización de alternativas terapéuticas más rentables y seguras. Un claro ejemplo es la utilización de terapias con células CAR-NK.

EFFECTOS ADVERSOS DE LAS TERAPIAS CAR-T
Toxicidad neurológica provocando el síndrome de efecto inmune asociado a células (ICANS).
Toxicidad adversa en todo el organismo provocando el síndrome de lanzamiento de citocinas (CRS).
Elevado coste de manufactura y terapias.
Mayor tiempo de hospitalización de los pacientes.

**Fuente:** Elaboración propia.

## Receptor car en células NK (CAR-NK)

Las células NK son especialistas del sistema inmunológico innato y grandes protagonistas en la defensa contra infecciones virales y cáncer. La citotoxicidad natural de las células NK puede desencadenarse rápidamente con una estimulación adecuada y está regulada por un importante equilibrio de señales provenientes de receptores activadores e

inhibidores de la superficie celular codificados en la línea germinal (1,4)

A pesar de que las células cancerígenas son capaces de disminuir la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I) haciéndolas invisibles para las células T, las células NK si pueden reconocer la falta de estas moléculas y actuar bajo una estimulación missing-self (2). La expresión disminuida de las moléculas HLA del

MHC junto con la expresión de otros receptores activadores como Nkp30, Nkp44 y NKG2D sensibiliza a las células cancerígenas para ser un blanco más fácil de las células NK (3,4).

Cómo se mencionó con anterioridad, los receptores CAR de cuarta generación conducen a que la célula tenga actividades citotóxicas excesivas no deseadas. Una de las mejoras que se incluyen en las CAR-T es un switch de suicidio. No obstante, debido a la corta vida y seguridad de las CAR-NK, es probable que este tipo de switch no sea necesario en las CAR-NK, aunque sí ha sido

utilizado. Estudios preclínicos demuestran gran eficiencia de células CAR-NK que pueden sacrificarse mediante la inducción de la Caspasa 9 (iCas9) mediante la inducción dimerizativa química (CID) (11).

En la mayoría de los casos donde se emplea una terapia con el receptor CAR en células NK se ha utilizado el subtipo NK-92, aunque también han sido utilizadas en menor medida células NK provenientes de a) Sangre cordal, de b) Sangre periférica y c) Células NK inducidas de células tallo pluripotenciales o iPSC (ver Tabla 3) (4,5).

**Tabla 3.** Tipos de células NK empleadas en las terapias con células CAR-NK y sus características generales: La ingeniería genética apunta a superar la resistencia y problemas que presentan cada uno de los fenotipos de células NK y así, convertirlas en células mejor preparadas en las terapias con receptores CAR de acuerdo con las necesidades que se presenten para cada paciente.

TIPO DE CÉLULAS CAR-NK	CARACTERÍSTICAS GENERALES
NK-92.	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Es el subtipo de NK más utilizado, ampliamente citotóxicas. Cuentan con pocos receptores inhibidores (NKG2A, ILT-2, KIR).</li> <li>-No tienen el receptor CD16, por lo que no pueden eliminar células por citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC).</li> <li>-Son inestables genómicamente, y los pacientes necesitan radiación previa a la administración.</li> </ul>
CÉLULAS NK DE SANGRE CORDAL (CB).	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Fenotipo inmaduro.</li> <li>-Pobrementemente citotóxicas.</li> <li>-Gran expresión de receptores inhibidores (NKG2A).</li> <li>-Gran capacidad de expansión.</li> <li>-Son fácilmente adquiribles de un banco de sangre de cordón umbilical.</li> </ul>
CÉLULAS NK DE SANGRE PERIFÉRICA (PB).	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Fenotipo maduro.</li> <li>-Altamente citotóxicas.</li> <li>-Poca capacidad de expansión clonal.</li> <li>-Son aplicables entre donadores y pacientes no compatibles con HLA.</li> </ul>
NK INDUCIDAS DE CÉLULAS TALLO PLURIPOTENCIALES (iPSC).	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Capacidad ilimitada de expansión clonal.</li> <li>-Baja citotoxicidad debido a que son aisladas de iPSC provenientes de fibroblastos.</li> <li>-Baja expresión de CD16</li> </ul>

**Fuente:** Elaboración propia.

Las células NK-92 son muy parecidas fenotípicamente a sus hermanas NK CD56<sup>Bright</sup>, aunque a diferencia de estas, tienen un nivel de citotoxicidad bastante alto ya que cuentan con receptores estimuladores como lo son NKp30, NKp46 y NKG2D, y muy pocos receptores inhibidores como ILT-2, NKG2A y miembros de la familia KIR. Además, las células NK-92 carecen del receptor CD16, haciendo imposible la eliminación tumoral mediante la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), por lo que la ingeniería de las células CAR apunta a la expresión de este receptor, que junto con inducción de INF- $\gamma$ , la células NK-92 puedan ejercer una mejor eliminación de células tumorales (18). Desafortunadamente, las células NK-92 son positivas para el virus de Epstein-Barr, además de que son líneas celulares derivadas de linfomas, por lo que cargan con una gran inestabilidad genética que las hace un poco eficientes tras su aplicación, de hecho, es necesario aplicar radicación a los pacientes previo a la administración de las células CAR NK-92. Recientemente, las células CAR NK-92 han sido armadas con un receptor de cuarta generación que originalmente iba dirigido a las células CAR-T llamado UniCAR, este receptor puede ser modificado para ser específico en el ataque de cada tipo de tumor (3, 19).

La sangre cordal tiene una gran cantidad de células NK (NK-CB), aunque son bastante malas en cuanto a su actividad citotóxica. La mayoría son del tipo CD56<sup>Bright</sup>, por lo que cuentan con fenotipo más inmaduro

con una reducción en la expresión de receptores activadores, además, no cuentan con el receptor CD16 y sumado a esto, cuentan con elevada expresión del receptor inhibidor NKG2A que al unirse al ligando HLA-E sobreexpresado en las células tumorales, hace que la células NK-CB pierdan mucha eficacia (20). Pese a todas estas malas características, las células NK-CB representan el 15 al 30% de la población de linfocitos de la sangre cordal, además, los bancos de sangre proveniente del cordón umbilical hacen que este tipo de célula sea fácil y barata de adquirir. Las células NK-CB son muy sensibles a la estimulación con citocinas, y uno de los rasgos más importantes es que cuentan con una gran capacidad proliferativa que se desempeña mejor bajo la estimulación de ciertas citocinas como IL-2 o IL-15. La ingeniería con receptores CAR se dirige a la eliminación o reducción en la expresión del receptor NKG2A de este tipo de célula (3,10, 21).

Las células NK provenientes de la sangre periférica son en 90% del tipo CD56<sup>Dim</sup>, teniendo una gran capacidad citotóxica y un fenotipo más maduro en comparación con las células NK-CB, aunque estas carecen de una buena habilidad proliferativa (22). Las células NK de sangre periférica que son utilizadas para la ingeniería con el receptor CAR, pueden ser del tipo “HLA-no coincidente” por lo que aumenta considerablemente el número de donadores de los que se pueden extraer. Este tipo de células NK están siendo utilizadas actualmente para

tratar leucemia mieloide aguda, aunque el pronóstico es difícil de predecir (4).

Del último tipo de células NK que son candidatas para el receptor CAR, encontramos a las células NK inducidas de células tallo pluripotenciales. El hecho que sean derivadas de células tallo, le confiere a la célula NK, en teoría, la habilidad ilimitada de clonarse por sí sola. No obstante, el fenotipo obtenido es inmaduro, presentando también una baja expresión del receptor CD16 y una alta expresión del receptor NKG2A, esto se debe a que las células iPSC se obtienen a su vez de células que no son del linaje hematológico, como fibroblastos (23, 24). La célula CAR- NK FT596 que expresa un constructo CD16 y un receptor para IL-15 está lista para ser probada en terapias experimentales junto anticuerpos monoclonales CD20, esto gracias a que algunas pruebas de linfomas CD19<sup>+</sup> en ratones arrojaron resultados favorables con este tipo de células CAR-NK (25).

Estudios con CAR-NK han sido efectuados contra linfomas de células B mediante células NK de una transfusión de sangre cordal. Estas fueron sometidas a la transducción con un vector retroviral para sintetizar una cadena scFV contra el antígeno CD19 y un switch de suicidio iCas9. Esta terapia mostró grandes resultados, especialmente cuando las células CAR-NK fueron estimuladas con IL-15 para su proliferación (4). Cabe destacar que una de las desventajas observadas en esta terapia con CAR-NK, es

la carencia en la proliferación de estas a causa de una falta de estimulación proveniente de citocinas como IL-2 o IL-15, tal como se mencionó anteriormente (1,11)

El combate de tumores sólidos con células CAR-NK resulta más complicado si lo comparamos con la eliminación de linfomas de linfomas. Las estrategias de escape tumoral engloban la secreción de citocinas inhibitorias, cómo el factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ), la desregulación de ligandos en las células tumorales y la influencia del microambiente tumoral (TME). A pesar de estos mecanismos de evasión inmunológica, a la fecha se ha efectuado el uso de CAR-NK con el receptor HER-2 para cáncer de ovario (26), el receptor para el antígeno específico de membrana prostática en cáncer de próstata, y el receptor NKG2D para múltiples tumores sólidos. De manera similar, células CAR-NK estimuladas con EGFR (Epidermal growth factor receptor) mostraron resultados favorables en glioblastoma en modelos de ratones, (27).

Desde un principio, con la creación de receptores CAR de primera generación se mencionó la idea de que los receptores CAR serían funcionales en células NK. Hoy en día, las terapias con células CAR-NK están todavía en pleno desarrollo (28). Se identificaron alrededor del mundo 520 casos activos de terapias con células CAR, con un total de 64 células diferentes, no obstante, el 96.4% eran células CAR-T. Esto es debido principalmente a la complejidad



de asimilar, activar, expandir y modificar las células NK (29, 30).

Entre las herramientas utilizadas en favor de la mejora en los problemas presentados de la utilización de células CAR-NK, encontramos el uso de transducción viral, la utilización en desuso de la electroporación y el empleo de transposones con el fin de mitigar la resistencia que tienen las células NK a ser modificadas genéticamente. El *Polybrene*, junto con *Retronectin*, ambos polímeros sintéticos, están siendo utilizados con el fin de facilitar la entrada del virus a la célula (31, 32). Un punto muy interesante es que los estudios realizados en la evaluación del nivel de expresión del receptor CAR en células NK que fueron sometidas a la ingeniería genética mediante electroporación, es que las células sólo retenían el receptor por 3 o 5 días, por lo que la electroporación está siendo descartada para modificar a las células NK (33, 34). Finalmente el uso de transposones o genes saltarines es una herramienta muy prometedora por la habilidad de estos en insertar material genético estable en el DNA de las células blanco. Entre los transposones utilizados recientemente en CAR-NK encontramos a piggyBac y a sleeping beauty (SB) (35, 36).

## Conclusiones

De manera general, hemos dilucidado las características y estructura de los receptores CAR, donde pudimos observar la im-

portancia que tiene cada uno de los componentes que contiene, y cómo estos han ido evolucionando a lo largo del tiempo dando paso a generaciones del receptor CAR más avanzadas y eficientes.

También, nos damos cuenta de los múltiples obstáculos que aún hoy en día dificultan el avance de las terapias con células CAR-NK y CAR-T, los cuales están en camino a ser superados con el fin de iniciar nuevas fases en varios ensayos clínicos.

Con todas la ventajas que presenta el uso de células CAR-NK sobre las células CAR-T, observamos que la innovación presente en esta herramienta promueve el ímpetu de la búsqueda de nuevas estrategias y tecnología para el combate contra el cáncer.

## Agradecimientos

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por la financiación y apoyo otorgado.

## Referencias

1. Zhang C, Oberoi P, Oelsner S, Waldmann A, Lindner A, Tonn T, et al. Chimeric Antigen Receptor-Engineered NK-92 Cells: An Off-the-Shelf Cellular Therapeutic for Targeted Elimination of Cancer Cells and Induction of Protective Antitumor Immunity. *Front Immunol.* 2017;8(533). doi: 10.3389/fimmu.2017.00533.
2. Habib S, Tariq SM, Tariq M. Chimeric Antigen Receptor-Natural Killer Cells: The Future of Cancer Immunotherapy. *Ochsner J.* 2019;19(3):186-187. doi: 10.31486/toj.19.0033.

3. Daher M, Basar R, Gokdemir E, Baran N, Uprety N, Nunez Cortes AK, et al. Targeting a cytokine checkpoint enhances the fitness of armored cord blood CAR-NK cells. *Blood*. 2021;137(5):624-636. doi: 10.1182/blood.2020007748.
4. Daher M, Rezvani K. Next generation natural killer cells for cancer immunotherapy: the promise of genetic engineering. *Curr Opin Immunol*. 2018;51:146-153. doi: 10.1016/j.coi.2018.03.013.
5. Pfefferle A, Huntington ND. You Have Got a Fast CAR: Chimeric Antigen Receptor NK Cells in Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3):706. doi: 10.3390/cancers12030706.
6. Glienke W, Esser R, Priesner C, Suerth JD, Schambach A, Wels WS, et al. Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells. *Front Pharmacol*. 2015;6:21. doi: 10.3389/fphar.2015.00021.
7. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov*. 2013;3(4):388-98. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0548
8. Barrett DM, Singh N, Porter DL, Grupp SA, June CH. Chimeric antigen receptor therapy for cancer. *Annu Rev Med*. 2014;65:333-47. doi: 10.1146/annurev-med-060512-150254.
9. Stone JD, Chervin AS, Kranz DM. T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. *Immunology*. 2009;126(2):165-76. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03015.x.
10. Bridgeman JS, Hawkins RE, Hombach AA, Abken H, Gilham DE. Building better chimeric antigen receptors for adoptive T cell therapy. *Curr Gene Ther*. 2010;10(2):77-90. doi: 10.2174/156652310791111001.
11. Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(8):1145-54. doi: 10.1517/14712598.2015.1046430.
12. Liu E, Marin D, Banerjee P, Macapinlac HA, Thompson P, Basar R, et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med*. 2020;382(6):545-553. doi: 10.1056/NEJMoa1910607.
13. Daher M, Rezvani K. Outlook for New CAR-Based Therapies with a Focus on CAR NK Cells: What Lies Beyond CAR-Engineered T Cells in the Race against Cancer. *Cancer Discov*. 2021;11(1):45-58. doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-0556.
14. Krause A, Guo HF, Latouche JB, Tan C, Cheung NK, Sadelain M. Antigen-dependent CD28 signaling selectively enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes. *J Exp Med*. 1998;188(4):619-26. doi: 10.1084/jem.188.4.619.
15. Eshhar Z, Waks T, Bendavid A, Schindler DG. Functional expression of chimeric receptor genes in human T cells. *J Immunol Methods*. 2001;248(1-2):67-76. doi: 10.1016/s0022-1759(00)00343-4.
16. Milone MC, Fish JD, Carpenito C, Carroll RG, Binder GK, Teachey D, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Mol Ther*. 2009;17(8):1453-64. doi: 10.1038/mt.2009.83.
17. Till BG, Jensen MC, Wang J, Qian X, Gopal AK, Maloney DG, et al. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood*. 2012;119(17):3940-50. doi: 10.1182/blood-2011-10-387969.
18. Cairo MS, Coiffier B, Reiter A, Younes A; TLS Expert Panel. Recommendations for the evaluation of risk and prophylaxis of tumour lysis syndrome (TLS) in adults and children with malignant diseases: an expert TLS panel consensus. *Br J Haematol*. 2010;149(4):578-86. doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08143.x.
19. Bollino D, Webb TJ. Chimeric antigen receptor-engineered natural killer and natural killer T cells for cancer immunotherapy. *Transl Res*. 2017;187:32-43. doi: 10.1016/j.trsl.2017.06.003.

20. Bear AS, Morgan RA, Cornetta K, June CH, Binder-Scholl G, Dudley ME, et al. Replication-competent retroviruses in gene-modified T cells used in clinical trials: is it time to revise the testing requirements? *Mol Ther.* 2012;20(2):246-9. doi: 10.1038/mt.2011.288.
21. Zhang C, Burger MC, Jennewein L, Genßler S, Schönfeld K, Zeiner P, et al. ErbB2/HER2-Specific NK Cells for Targeted Therapy of Glioblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 2015;108(5). doi: 10.1093/jnci/djv375.
22. MacLeod RA, Nagel S, Kaufmann M, Greulich-Bode K, Drexler HG. Multicolor-FISH analysis of a natural killer cell line (NK-92). *Leuk Res.* 2002;26(11):1027-33. doi: 10.1016/s0145-2126(02)00055-3.
23. André P, Denis C, Soulas C, Bourbon-Caillet C, Lopez J, Arnoux T, et al. Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells. *Cell.* 2018;175(7):1731-1743.e13. doi: 10.1016/j.cell.2018.10.014.
24. Kamiya T, Seow SV, Wong D, Robinson M, Campana D. Blocking expression of inhibitory receptor NKG2A overcomes tumor resistance to NK cells. *J Clin Invest.* 2019;129(5):2094-2106. doi: 10.1172/JCI123955.
25. Björklund AT, Carlsten M, Sohlberg E, Liu LL, Clancy T, Karimi M, et al. Complete Remission with Reduction of High-Risk Clones following Haploidentical NK-Cell Therapy against MDS and AML. *Clin Cancer Res.* 2018;24(8):1834-1844. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3196.
26. Knorr DA, Ni Z, Hermanson D, Hexum MK, Bendzick L, Cooper LJ, et al. Clinical-scale derivation of natural killer cells from human pluripotent stem cells for cancer therapy. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2(4):274-83. doi: 10.5966/sctm.2012-0084.
27. Valamehr B, Robinson M, Abujarour R, Rezner B, Vranceanu F, Le T, et al. Platform for induction and maintenance of transgene-free hiPSCs resembling ground state pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports.* 2014;2(3):366-81. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.01.014.
28. Saetersmoen ML, Hammer Q, Valamehr B, Kaufman DS, Malmberg KJ. Off-the-shelf cell therapy with induced pluripotent stem cell-derived natural killer cells. *Semin Immunopathol.* 2019;41(1):59-68. doi: 10.1007/s00281-018-0721-x.
29. Kruschinski A, Moosmann A, Poschke I, Norell H, Chmielewski M, Seliger B, et al. Engineering antigen-specific primary human NK cells against HER-2 positive carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(45):17481-6. doi: 10.1073/pnas.0804788105.
30. Han J, Chu J, Keung Chan W, Zhang J, Wang Y, Cohen JB, et al. CAR-Engineered NK Cells Targeting Wild-Type EGFR and EGFRvIII Enhance Killing of Glioblastoma and Patient-Derived Glioblastoma Stem Cells. *Sci Rep.* 2015;5:11483. doi: 10.1038/srep11483.
31. MacKay M, Afshinnekoo E, Rub J, Hassan C, Khunte M, Baskaran N, et al. The therapeutic landscape for cells engineered with chimeric antigen receptors. *Nat Biotechnol.* 2020;38(2):233-244. doi: 10.1038/s41587-019-0329-2.
32. Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D, Hashino K, Kato I, Williams DA. Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med.* 1996;2(8):876-82. doi: 10.1038/nm0896-876.
33. Davis HE, Morgan JR, Yarmush ML. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys Chem.* 2002;97(2-3):159-72. doi: 10.1016/s0301-4622(02)00057-1.
34. Xiao L, Cen D, Gan H, Sun Y, Huang N, Xiong H, et al. Adoptive Transfer of NKG2D CAR mRNA-Engineered Natural Killer Cells in Colorectal Cancer Patients. *Mol Ther.* 2019;27(6):1114-1125. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.03.011.

35. Rostovskaya M, Fu J, Obst M, Baer I, Weidlich S, Wang H, et al. Transposon-mediated BAC transgenesis in human ES cells. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(19):e150. doi: 10.1093/nar/gks643.
36. Kebriaei P, Izsvák Z, Narayanavari SA, Singh H, Ivics Z. Gene Therapy with the Sleeping Beauty Transposon System. *Trends Genet.* 2017;33(11):852-870. doi: 10.1016/j.tig.2017.08.008.

# El Deterioro Cognitivo como una complicación de la Diabetes Mellitus Tipo 2

Cognitive Impairment as a Type 2 Diabetes Mellitus complication

Shadye Rocío Matar-Khalil<sup>1</sup>, Fabio Camilo Rubio-Sandoval<sup>2</sup>

## Resumen

**Introducción.** La Diabetes Mellitus es una enfermedad compleja que impacta la salud pública debido a su alta prevalencia, el costo que implica y complicaciones asociadas como lo es la alteración cognitiva. **Metodología.** Se realizó una revisión de tema consultando literatura nacional e internacional en bases de datos de ciencias sociales y ciencias de la salud entre los años 1990-2019 que exponen la posible asociación entre la diabetes mellitus y deterioro cognitivo, así como las posibles rutas que lo conllevan. **Resultados.** La literatura consultada plantea una relación entre la diabetes mellitus y complicaciones del sistema nervioso central, lesiones neurológicas, deficiencias en la capacidad de atención, pérdida de la memoria, deterioro cognitivo, un considerable incremento en el riesgo de desarrollar demencia y demencia tipo Alzheimer, sin embargo, no se evidencia un consenso en el grado de afectación que pueda tener sobre los procesos cognitivos. **Conclusiones.** La naturaleza progresiva tanto de la diabetes mellitus, así como el riesgo vascular asociado, sugieren la necesidad de realizar prevención del deterioro cognitivo en pacientes diagnosticados con diabetes mellitus, a partir de una evaluación integral que incluya pruebas neuropsicológicas dentro de los exámenes de rutina.

**Palabras claves:** cognición, diabetes mellitus, complicaciones de la diabetes.

1. Psicóloga, PhD. en psicología con orientación en neurociencia cognitiva. Docente Universidad Nacional Abierta y a Distancia-UNAD. Bogotá, Colombia.  
Correo electrónico: shadye.matar@unad.edu.co  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2250-9794>

2. Organización Internacional para las Migraciones (OIM). Licenciado en biología, especialista en epidemiología. Tunja, Boyacá, Colombia.  
Correo electrónico: camilo82rubio@gmail.com  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6837-6296>

## Abstract

**Introduction:** Diabetes mellitus is a complex and chronic disease that has an impact on public health due to its high prevalence, the implicit economic cost and associated complications like cognitive alterations. **Methodology:** A review of the topic was carried out across national and international literature in databases of social sciences and health sciences between the years 1990-2019 that expose the possible association between diabetes mellitus and cognitive impairment, as well as the possible routes that lead to cognitive alterations. **Results:** The consulted literature exposed a link between diabetes mellitus and complications of the central nervous system, neurological lesions, attention capacity deficiencies, memory loss, cognitive impairment, and a considerable increase in the risk of developing dementia and Alzheimer's type dementia. **Conclusions:** The progressive nature of both diabetes mellitus, and associated vascular risk, suggest the need for prevention of cognitive impairment based on a comprehensive evaluation that includes neuropsychological tests within routine examinations in patients diagnosed with diabetes mellitus.

**Keywords:** cognition, diabetes mellitus, diabetes complications.

## Introducción

De acuerdo con estimaciones realizadas por la Federación Internacional de Diabetes, para el año 2019 se contaban 463 millones de adultos (20-79 años) con diabetes mellitus (DM) en todo el mundo y se calcula que este número aumentará a 578.4 millones para el año 2030 y 700.2 millones para el año 2045 (1). Existe un marcado incremento en la prevalencia de la enfermedad desde mitad del siglo pasado (2), tendencia que se mantendrá durante el presente siglo a medida que las condiciones y estilos vida de las poblaciones humanas se tornen cada vez más sedentarias, y con mayor velocidad de aumento en países en vías de desarrollo (1-3).

La mayoría de los nuevos casos de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) ocurren en un contexto de estilo de vida sedentario; dietas ricas en grasas y poco ejercicio físico, lo que conduce al aumento de la obesidad, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia compensadora, insuficiencia de células  $\beta$  y, finalmente DM (4).

Además, se calcula que 300 millones de personas presentan características que indican un riesgo de sufrir DM2 en el futuro, como hiperglicemia en ayunas, intolerancia a la glucosa (IG), diabetes mellitus gestacional (DMG) y resistencia a la insulina (RI) en euglucemia (4). Lo cual hace que desde un punto de vista epidemiológico la diabetes



sea una de las enfermedades crónicas no transmisibles con mayor importancia para los programas mundiales de salud, e implica un mayor número de personas que deberán ser atendidas a causa de complicaciones relacionadas a dicho síndrome metabólico durante los próximos años.

La diabetes tipo 1 (DM1) ha sido típicamente relacionada con pacientes jóvenes, mientras que la DM2 se ha relacionado exclusivamente a pacientes adultos, sin embargo, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) el número de pacientes jóvenes diagnosticados con DM2 se encuentra en aumento (3) posiblemente debido al incremento en las tasas de sobrepeso y obesidad en este grupo poblacional, condición descrita como un factor de riesgo en el desarrollo de la patología (4)

A medida que aumenta el número de pacientes diagnosticados con DM2 también es posible encontrar un mayor número de publicaciones que plantean una relación entre la diabetes y complicaciones del sistema nervioso central, lesiones neurológicas, deficiencias en la capacidad de atención, pérdida de la memoria, y deterioro cognitivo; aunque en la actualidad no se ha logrado un consenso que establezca el nivel de asociación entre estas variables y la presencia de DM2. Por tanto, este artículo presenta una revisión de publicaciones durante los últimos veinte años que exponen la posible asociación entre la DM2 y deterioro cognitivo, así como posibles rutas que conllevan al deterioro de la cognición.

## Metodología

Se hizo una revisión de tema consultando literatura nacional e internacional de los últimos veinte años en las bases de datos de ciencias sociales y ciencias de la salud (Web of Science, PsycInfo, PubMed, Dialnet, Redalyc, ScieELO, ScienceDirect Medline) en inglés y español, usando como descriptores para la búsqueda diabetes mellitus tipo 2, funciones cognitivas, deterioro cognitivo y demencia. Los artículos fueron seleccionados teniendo como criterio que el objetivo del estudio abordara la evaluación neuropsicológica a pacientes diabéticos tipo 2 y estudios que explicaran la posible asociación entre la DM2 y el deterioro cognitivo, así como posibles rutas que conllevan al deterioro de la cognición.

## Diabetes

La diabetes es descrita como *“un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por la presencia de hiperglicemia crónica (aumento anormal de la cantidad de glucosa en sangre), con alteración del metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas... debido a dos defectos metabólicos implicados en la etiología de la enfermedad; La resistencia a la insulina o el déficit en su secreción (5)”*.

El término metabolismo describe los procesos de interconversión de compuestos químicos en el organismo, las vías que siguen

las moléculas individuales y sus interrelaciones. Una de las moléculas de mayor importancia para el adecuado funcionamiento del metabolismo es la glucosa toda vez que este carbohidrato es el principal combustible metabólico de casi todos los tejidos, en especial para el sistema nervioso central y eritrocitos (6).

A diferencia de las células hepáticas que son permeables a la glucosa, es decir que permiten su paso libremente, las células extrahepáticas son relativamente impermeables a la glucosa, y su transporte a través de las membranas celulares está mediado por la hormona insulina, producida y secretada por células  $\beta$  de los islotes de Langerhans, en el páncreas, en respuesta a hiperglucemia, estimulando al hígado para que almacene glucosa como glucógeno, y facilitando la captación de glucosa hacia tejidos extrahepáticos (6).

No obstante, el metabolismo de carbohidratos y por ende el control de los niveles de glucosa en sangre se ven alterados de dos formas particulares, a través de la incapacidad del individuo para sintetizar y secretar insulina debido a la progresiva destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas como ocurre en la DM1, y a través de la combinación entre la resistencia a la acción de la insulina (sensibilidad alterada) por parte de los tejidos y una inadecuada respuesta en la compensación de la euglicemia como ocurre en la DM2 (7).

La destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas, en la DM1, se debe a una reacción au-

toinmune, en la que el sistema de defensa del cuerpo ataca y destruye a dichas células. Como resultado, el páncreas deja de producir la insulina necesaria para la absorción de azúcar presente en la sangre (4). Por lo tanto, las personas que padecen DM1 necesitan la administración de frecuentes dosis de insulina (insulino dependientes) con el fin de controlar sus niveles de azúcar y mantener un adecuado metabolismo de los carbohidratos ingeridos.

En la DM2 aun cuando el páncreas si puede producir insulina los tejidos presentan una sensibilidad alterada a su acción, de modo que la insulina producida se torna ineficaz en el proceso de asimilación de la glucosa (insulino requiriente), lo cual se traduce en episodios recurrentes de hiperglicemia, y aun cuando la etiología de la DM2 se encuentra en estudio, existen varios factores de riesgo que cobran una significativa relevancia en su desarrollo; el sobrepeso, la inactividad física o sedentarismo y una nutrición pobre.

La diabetes al involucrar procesos metabólicos, es la causa de una gran variedad de complicaciones que involucran a todos los sistemas del organismo y entre las cuales se encuentran; retinopatía, nefropatía, neuropatías asociadas a múltiples manifestaciones, disfunción cognitiva, diversas manifestaciones de enfermedad vascular, enfermedad coronaria, enfermedad vascular periférica, alteraciones metabólicas asociadas con la dislipidemia (Niveles anormales de lípidos en la sangre) cetoacidosis e hipoglicemia (3, 5, 7).

Las complicaciones de la diabetes han sido divididas en dos grupos; complicaciones microvasculares (microangiopatía) y complicaciones macrovasculares, las primeras se refieren a aquellas complicaciones relacionadas con afectaciones de capilares, mientras las segundas hacen referencia a afectaciones de grandes vasos sanguíneos. Dentro de las complicaciones microvasculares se incluyen la retinopatía (afectación de la retina) que representa la primer causa de ceguera irreversible en personas en edades de 16 a 64 en países en vías de desarrollo (8) la nefropatía (afectación de glomérulos renales) que representa una elevada carga de morbilidad al evolucionar a insuficiencia renal y neuropatía (afectación de nervios periféricos) que puede evolucionar en ulceración, infección y amputación de extremidades inferiores debido al daño en los nervios acompañado de alteración en la circulación en los pies como resultado de daño en vasos sanguíneos (4). Las complicaciones macrovasculares incluyen enfermedad coronaria que es la causa de muerte más común entre los pacientes diabéticos, trombosis e hipertensión arterial (5, 9).

De manera particular las afectaciones al sistema nervioso central relacionadas a la presencia de diabetes han sido reportadas desde inicios del siglo XX. En la década de 1920 Miles y Root (10) ya planteaban una relación entre la diabetes y lesiones neurológicas, psicosis, deficiencias en la capacidad de atención y pérdida de la memoria; posteriormente Dejgaard estimaba que la prevalencia de afectación en el sistema ner-

vioso central o “encefalopatía diabética” en pacientes con diabetes podría ser superior al 40% (11), más recientemente se ha asociado a la diabetes con un bajo desempeño cognitivo y un incremento en el riesgo de desarrollar demencia (12-15). Dichas complicaciones parecen estar vinculadas al mantenimiento de altos niveles de glicemia a través del tiempo en pacientes diagnosticados con diabetes (16), toda vez que las condiciones fisiológicas generadas por un estado crónico de hiperglicemia conllevan un exceso oxidativo de moléculas de glucosa y la glicación no enzimática de proteínas, causando daño estructural en tejidos y órganos (17, 18).

Una condición crónica de hiperglucemia ya sea por la baja producción de insulina en las células pancreáticas o por la resistencia a su acción y en consecuencia fallas en la asimilación de glucosa, genera el desabastecimiento del combustible metabólico necesario para el funcionamiento celular, incluido la generación de potenciales de acción en axones neuronales, así como también ocasiona la glicación no enzimática de proteínas, factor que actúa como un elemento neurodegenerativo (19-22) y que podría contribuir en la aparición de anomalías micro-estructurales de la materia blanca cerebral (23, 24), o anomalías de origen vascular debidas a infartos y micro infartos de la vasculatura cerebral relacionados a procesos de demencia en pacientes con DM2 (25).

Por lo tanto, y partiendo de la premisa que no se ha desarrollado un tratamiento

que permita la cura de la diabetes, la prevención de las complicaciones relacionadas, tanto en pacientes diagnosticados con DM1 como DM2 ha centrado su atención en el monitoreo y control de los niveles de la glucemia a través de la evaluación periódica de los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c), con el objetivo de mantener los niveles de azúcar en un punto en el cual se disminuya el riesgo de la presentación de complicaciones micro o macro vasculares (26-28).

### ***Cognición y diabetes***

La cognición puede ser entendida como el proceso del pensamiento, o como el procesamiento mental de la información (29). La cognición incluye aquellos procesos a través de los cuales un estímulo interno o externo, es captado mediante la percepción, es transformado en señales comprensibles por el cerebro, es reducido a aquellos elementos que ameritan atención, es elaborado y almacenado en la memoria, recuperado y usado a través no solo de pensamientos sino también a través de las acciones resultado de los estímulos (30). De tal forma que la mente es un activo selector de información del ambiente, relacionando dicha información con el conocimiento previamente adquirido y generando una respuesta sobre los resultados del proceso.

Por lo tanto, el individuo no actúa como una entidad pasiva que se encuentra a mer-

ced de las señales del entorno. Por el contrario, el individuo a través de la cognición tiene la capacidad de buscar información enfocando de manera consciente sus recursos atencionales, seleccionarla, manipularla y reconstruirla en forma de memorias, en un proceso que ocurre bajo un esquema de interacción entre la información proveniente del entorno, la naturaleza del sistema de procesamiento y los conocimientos previos (31).

Lo que el individuo conoce acerca del entorno ha sido intervenido por la actividad cognitiva en la medida en que la cognición brinda el ensamblaje necesario para interpretar y reinterpretar la información sensorial, relativa a las características propias de los elementos del entorno, que es captada por los órganos de los sentidos. Interactuando en esta intervención aspectos de la cognición como las sensaciones, percepciones, imaginación, retención, recuperación, resolución de problemas y pensamiento (32).

Así, en los procesos cognitivos intervienen múltiples funciones mentales superiores, mencionadas por Ulric Neisser como “hipotéticas etapas o aspectos de la cognición” (31) y que en un contexto cotidiano pueden ser entendidas como habilidades; el lenguaje, la imaginación, la planificación, el control ejecutivo de las acciones, la percepción, atención, memoria, toma de decisiones, razonamiento y resolución de problemas. En consecuencia, estas funciones, habilidades, juegan un importante papel en el desenvolvimiento e interacción del individuo

en y con el entorno, en la percepción de sí mismo y la percepción de otros individuos.

Los procesos cognitivos son susceptibles a cambios que se presenten en su sustrato neurológico, por lo tanto, procesos bioquímicos adversos que se den de forma sostenida por largos periodos de tiempo como ocurre a los pacientes con DM2 y que conlleven algún tipo de daño o cambios a nivel neural, tendrán repercusión en los procesos cognitivos. De tal forma que el procesamiento mental de la información puede verse comprometido toda vez que surgen cambios en áreas del cerebro asociadas a uno o más dominios cognitivos; funciones ejecutivas, velocidad de procesamiento, atención y memoria entre otros, y aun cuando estos cambios se dan de manera natural y continua, gracias a la plasticidad cerebral, también conocida como neuroplasticidad, que favorece la adaptación del cerebro durante el desarrollo del individuo, se pueden generar consecuencias negativas al presentarse de manera sostenida y prolongada bajo situaciones de estrés metabólico, (19, 20), al igual que del estrés psicológico tal como parece ocurrir debido a las variaciones tanto de insulina como de glucosa a nivel de cerebro en los pacientes con diabetes (21). Al respecto, Strachan plantea una asociación entre la hiperglicemia aguda y deficiencias en la memoria de trabajo y atención (33), en contraste, un temprano control de la hiperglicemia tiene el potencial para reducir el riesgo de complicaciones micro y macro vasculares (17).

Sobre la asociación entre DM1 y deficiencias cognitivas, la literatura describe afectaciones en múltiples dominios cognitivos (11, 34-36), sin embargo, estas manifestaciones han sido descritas en menor frecuencia y magnitud en pacientes con DM1 en comparación a pacientes con DM2 (11, 37). Adicionalmente, a través de imágenes de resonancia magnética se han detectado anomalías microestructurales de la materia blanca relacionadas a la presencia de diabetes (23, 24) pero significativamente más profundas en pacientes diagnosticados con DM2 en comparación con pacientes diagnosticados con DM1 (23) y las cuales se han asociado con lentitud en la velocidad de procesamiento de la información y un bajo desempeño en el dominio memoria (24). Por su parte Jacobson et al. (38) reportan no encontrar evidencia sustancial de un declive en la función cognitiva al realizar un estudio longitudinal por un periodo de 18 años en 1144 pacientes diagnosticados con DM1.

Es posible que ambas formas de diabetes afecten de formas diferentes el rendimiento cognitivo toda vez que la fisiopatología de ambas enfermedades es distinta y con edades de presentación disímiles, por lo que es razonable considerar que pudieran existir diferencias en cuanto al deterioro cognitivo asociado a cada una (39).

Fontbonne et al. (40) reportan una disminución en el desempeño de la atención, velocidad psicomotora y memoria luego de

cuatro años de seguimiento en sujetos diagnosticados con diabetes, en edades entre los 59 a 71 años, en comparación con dos grupos; un grupo control y un grupo sin diagnóstico de diabetes, pero con alteraciones de los niveles de glucosa en ayunas.

Nooyens et al. (15) al medir el desempeño cognitivo en una población de 2613 hombres y mujeres, en edades entre 40 a 73 años, mediante la aplicación de pruebas cognitivas dos veces en un intervalo de tiempo de 5 años, encontraron un declive dos veces mayor en memoria, flexibilidad cognitiva y funciones cognitivas globales de pacientes diagnosticados con DM2 (DM2 prevalente) respecto de los individuos que no presentaban diabetes. Con un marcado efecto de interacción entre la presentación de diabetes y la edad en la asociación entre diabetes y los posibles cambios en la flexibilidad cognitiva, motivo por el cual los autores dividen el análisis de la flexibilidad cognitiva entre pacientes en edades mayores o iguales a 60 años y menores de 60 años.

A su vez, Van den Berg et al. (41) al evaluar razonamiento abstracto, memoria, velocidad de procesamiento de la información, atención y funciones ejecutivas y visuoconstrucción, en 68 pacientes con DM2 y 38 controles no diabéticos en un intervalo de 4 años, describen un detrimento moderado en la velocidad de procesamiento de la información en comparación con el grupo control. Aun cuando para razonamiento abstracto y atención y funciones ejecutivas también se observa un declive, no hay dife-

rencias estadísticamente significativas entre el grupo DM2 y grupo control que permitan inferir una posible relación entre la presencia de DM2 y el declive en estos dominios cognitivos. Estos autores en contraste con los datos reportados por Nooyens et al. (15) en una población similar, no describen algún declive o disminución significativa en memoria, así como tampoco describen cambios en el dominio visuoconstrucción.

Así mismo, Velayudhan et al. (42) han reportado la presencia de DM2 como un significativo predictor en el desarrollo de demencia en adultos mayores. Novik et al. (43) reportan una asociación significativa entre la presencia de DM2 y la ocurrencia de deterioro cognitivo en una población chilena con una edad promedio mayor a los 70 años. Heidari et al. (44) observaron un bajo rendimiento al evaluar la memoria en pacientes con un tiempo de diagnóstico de DM2 mayor a 5 años, así como en aquellos recientemente diagnosticados, sin diferencias significativas en el desempeño de la memoria entre los dos grupos. Es de importancia resaltar que en niños y adolescentes no se ha encontrado evidencia de deterioro cognitivo relacionado con la diabetes (45).

De acuerdo con Ho et al. (19) los trastornos cognitivos en pacientes diabéticos parecen estar relacionados con alteraciones en neuroplasticidad, y adicionalmente, con una reducción en la acción central de la insulina la cual regula mecanismos neurales importantes para el control de procesos de la memoria (46). Paralelamente la hiperglucemia



crónica induce un alto estrés químico que favorece procesos celulares degenerativos especialmente en las células del hipocampo (19), estructura ligada a capacidades cognitivas como la memoria de trabajo (47). Willette *et al.* (48) muestran en su estudio que la resistencia a la insulina se asocia a un menor metabolismo de glucosa global a nivel cerebral, disminución que es particularmente significativa en el lóbulo temporal medial, el hipocampo, el cíngulo rostral y posterior y las regiones mediales de las cortezas parietal superior y occipital. Además, reportaron hipometabolismo bilateral en el cerebelo.

Al parecer la insulina es un modulador de los procesos cognitivos. Una de las primeras sugerencias de que la insulina podría desempeñar un papel importante en procesos cognitivos, proviene de los estudios de Zhao *et al.* (49) quienes demostraron que el entrenamiento en una tarea espacial aumentó la expresión del receptor de la insulina del hipocampo. La insulina hipocampal parece ser un componente clave de los procesos de memoria, y en el caso de la resistencia sistémica a la insulina que se presenta en la DM2 se ha asociado con déficit cognitivo (21). Por lo tanto, las alteraciones en la señalización de insulina cerebral pueden brindar una explicación en la ruta de los efectos cognitivos y neurales de la DM2.

La DM2 es un desorden metabólico altamente complejo y por lo tanto es de esperar que la fuente de cualquier deficiencia cognitiva asociada con ella presente un origen

en el que confluyan múltiples factores (33) que interactúen a través de vías como; estrés oxidativo, glicación no enzimática de proteínas, cambios epigenéticos, inflamación crónica (17) neurodegeneración (50, 51), enfermedad cerebrovascular (52, 53) o atrofia en regiones corticales tal como ocurre en la enfermedad de Alzheimer (50).

Tanto los productos finales de glicación, como la oxidación excesiva de moléculas de glucosa (glicooxidación) han sido reportados en concentraciones elevadas en pacientes con DM2 en comparación con no diabéticos (54-56). Se ha detectado un significativo incremento en la concentración de productos finales de glicación en pacientes con DM2 que presentan deterioro cognitivo respecto de aquellos pacientes con DM2 que no presentan deterioro cognitivo (18). Los productos finales de glicación no enzimática de proteínas, así como oxidación excesiva de moléculas de glucosa, se deben a condiciones de hiperglicemia, particularmente frecuentes en los casos de diabetes, y causan destrucción de las células al atacar y dañar sus proteínas estructurales, lo cual conlleva al deterioro de estructuras como el sistema nervioso central, particularmente frágil a estos ataques.

Adicionalmente se han observado mayores concentraciones de biomarcadores de neurodegeneración en líquido cefalorraquídeo (LCR) tales como oligómeros de Beta amiloide 1-42 ( $A\beta$ 1-42), proteína tau total y proteína tau fosforilada en pacientes con trastornos cognitivos asociados a DM2,

mecanismos que favorecen el deterioro de las habilidades cognitivas. También se ha asociado la DM2 con un menor grosor de regiones corticales como; giro y surco subcentral bilateral, surco precentral inferior derecho, gyrus rectus, surco frontal y medio (lóbulo frontal) y gyrus parietal inferior (50). Por lo tanto, es probable que la diabetes sea promotora de neurodegeneración, mecanismo que favorece el deterioro de las habilidades cognitivas. Así pues, como en una cascada de eventos desfavorables el deterioro de las habilidades cognitivas conlleva a su vez un deterioro en la calidad de vida del paciente diagnosticado con DM2 (57, 39)

Además, Fomiga et al (58) realizaron un análisis de diversos estudios que muestran la existencia de una asociación epidemiológica entre la DM y la demencia, específicamente la han relacionado con demencia vascular y con demencia tipo Alzheimer, entre los mecanismos potencialmente implicados en la relación del deterioro cognitivo y DM2 se encuentran la microangiopatía, hiperglucemia, hipoglucemia y la resistencia a la insulina.

Así mismo, se ha propuesto el término de diabetes tipo 3 para referirse a la resistencia a la insulina, entendida esta, como una disminución de la insulina cerebral que genera una inadecuada regulación de la enzima degradante de la insulina y la acumulación de beta-amiloide. De esta manera se brinda una visión integradora de los posibles mecanismos patogénicos comunes entre la DM2 y EA (58).

Dominguez et al. (59) examinaron los estudios originales de pruebas básicas, bioquímicas y clínicas con pacientes de Alzheimer, DM2 y pacientes con Alzheimer y DM2, concluyendo que, aunque existe una relación entre ambas, esta no está claramente esclarecida. Las hipótesis de dicha relación se presentan respecto a las alteraciones en las funciones de la insulina (resistencia y señalización), lesiones microcirculatorias, cambios metabólicos que llevan a la formación de los ovillos neurofibrilares y depósitos de proteína beta-amiloide en el tejido cerebral, desequilibrio oxidante y antioxidante (vías metabólicas y mecanismo de acción diferentes pero que confluyen en el contexto de estrés oxidativo mediado a través de radicales libres). No obstante, y de acuerdo con los autores, el deterioro cognitivo parece ser menor cuando Alzheimer y DM2 se presentan de forma concomitante en comparación con aquellos pacientes que solo presentan Alzheimer.

Por su parte, las lesiones de la materia blanca, en especial en adultos mayores, han sido asociadas con deficiencias cognitivas (60) inteligencia, atención y funciones ejecutivas, sin embargo, no se ha establecido una clara relación entre la diabetes como factor de riesgo y la ocurrencia de lesiones de la materia blanca (61). Aun cuando la resistencia a la insulina ha demostrado una fuerte correlación con este tipo de lesiones (62, 63), también las fluctuaciones en los niveles de glucosa determinados a través de hemoglobina glicosilada (HbA1c), parecen

jugar un importante papel en el declive cognitivo de pacientes con DM2 (64).

De acuerdo con Li y Huang (22) los mecanismos implicados en el deterioro cognitivo de pacientes con DM2, así como los mecanismos implicados en el desarrollo de demencia en pacientes con DM2 presentan una ruta común, en la cual la neurodegeneración es consecuencia de las alteraciones metabólicas en los ciclos de glúcidos, envejecimiento, hipertensión, el padecimiento de DM2 por un largo tiempo y elevados niveles de colesterol.

Además, la predisposición genética contribuye al aumento de riesgo de demencia en presencia de DM2. El alelo APOE ε4 es el factor genético más examinado en el aumento del riesgo de demencia asociada a DM (58).

Así como los anteriores estudios muestran que la diabetes está asociada al deterioro cognitivo, existen otros estudios como los de Colberg *et al.* (65) que evidencian que la actividad física reduce este riesgo. Blondell *et al.* (66) realizaron una revisión de estudios sobre la asociación de la actividad física y deterioro cognitivo y actividad física y demencia; el metanálisis sugiere que mayores niveles de actividad física en comparación con niveles más bajos tienen un riesgo reducido de deterioro cognitivo y demencia. Finalmente, una de las más recientes revisiones de literatura sobre este tema fue realizada por Hernández *et al.* (67) en la cual señalan que la actividad física en personas

con DM2 disminuye el riesgo cardiovascular ya que mejora el control metabólico, el peso y la sensibilidad a la insulina; por lo que la actividad física es señalada como uno de los pilares del tratamiento integral para la DM2.

## Conclusiones

La DM2 es una enfermedad crónica, con complicaciones asociadas, que implica un alto costo económico y social con altas repercusiones en la salud pública. Aun cuando se han generado numerosos estudios que han mostrado una posible relación entre la deficiencia cognitiva y la DM2, en la actualidad no se ha logrado un consenso que establezca el nivel de asociación entre estas dos variables o el grado de afectación de dominios cognitivos.

Diversos estudios reportan alteración en algunos de los dominios cognitivos, en la atención, la memoria de trabajo, la memoria verbal, memoria visual, el aprendizaje y la función ejecutiva (24, 40, 15, 41), indispensables en el procesamiento mental de la información y los cuales resultan de relevancia para el adecuado desenvolvimiento social del paciente y la adhesión de los tratamientos que se fundamentan en el autocuidado.

Otros estudios indican una asociación significativa entre la presencia de DM2 (43) y la ocurrencia de deterioro cognitivo y también

como un predictor en el desarrollo de demencia en adultos (42) y demencia tipo Alzheimer

La asociación entre el deterioro cognitivo en pacientes con DM2 se han relacionado con alteraciones en la neuroplasticidad (46), resistencia y señalización de la insulina (48), lesiones en la materia blanca (60), estrés oxidativo, glicación no enzimática de proteínas, cambios epigenéticos, inflamación crónica (17) neurodegeneración (50, 51), enfermedad cerebrovascular (52, 53) o atrofia en regiones corticales tal como ocurre en la enfermedad de Alzheimer, al observar mayor concentraciones de biomarcadores de neurodegeneración en líquido cefalorraquídeo (LCR) tales como oligómeros de Beta amiloide 1- 42 (A $\beta$ 1-42), proteína tau total y proteína tau fosforilada (50) y dentro de los factores determinantes del grado de deterioro cognitivo se describe la duración de la DM2 y la presencia de complicaciones por comorbilidades, enfermedad metabólica e hipertensión arterial.

Mientras, la asociación observada entre riesgo vascular y la resistencia a la insulina, a menudo denominada síndrome metabólico (SM), ha llevado a pensar que el riesgo cardiovascular aparece precozmente, antes de que se desarrolle la DM2, mientras que la relación estrecha entre hiperglucemia y enfermedad microvascular (encefalopatía, retinopatía, nefropatía, neuropatía) indica que este riesgo no se vuelve aparente hasta que aparece una hiperglucemia franca. Estos conceptos ponen de manifiesto la natu-

raleza progresiva tanto de la DM2 como del riesgo vascular asociado, lo que comporta desafíos específicos en las distintas fases de la vida de una persona con DM2. Los efectos de la edad avanzada, las comorbilidades y los problemas asociados con cada grupo específico indican la necesidad de enfocar el riesgo tomando en cuenta las características biopsicosociales e individualizantes que permitan brindar al paciente herramientas integrales para el manejo de su propia enfermedad.

Finalmente, para poder responder de forma contundente si el deterioro cognitivo es una complicación de la DM2 se concluye la necesidad de desarrollar investigaciones longitudinales que incluyan diferentes tipos de variables, como son: el tiempo de diagnóstico de la enfermedad, la adherencia al tratamiento, las comorbilidades, el alelo APOE e4, resonancia magnética, hemoglobina glicosilada, y la evaluación neurocognitiva y afectiva.

A la vez, al revisar las diferentes investigaciones es considerable realizar prevención del deterioro cognitivo en pacientes diagnosticados con DM2, a partir de una evaluación integral que incluya pruebas neuropsicológicas dentro de los exámenes de rutina, junto a un acompañamiento integral, en pro de mejorar el estilo y la calidad de vida del paciente, mediante un control de la comorbilidad de las enfermedades asociadas a la DM2. Además del manejo de emociones y el estrés y en mayor medida en pacientes con largo tiempo de diagnóstico de la enferme-

dad y en aquellos donde se identifique que un déficit cognitivo que pueda estar condicionando la adherencia al tratamiento.

De igual forma, se sugiere incluir dentro de las intervenciones integrales la realización de actividad física, el mantenimiento de una alimentación adecuada, y niveles controlados de la hemoglobina glicosilada.

## Referencias

1. Federación Internacional de la Diabetes. Atlas de la Diabetes de la FDI, novena edición. Bruselas, Bélgica; 2019. Disponible en: <https://www.diabetesatlas.org>
2. Ogurtsova K; da Rocha-Fernandes J; Huang Y; Linnenkamp U; Guariguata L; Cho N; et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017 Jun; 128:40-50. [https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227\(17\)30375-3/fulltext](https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227(17)30375-3/fulltext)
3. Organización Mundial de la Salud - OMS. Informe mundial sobre la diabetes. Ginebra, Suiza; 2016. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254649/9789243565255-spa.pdf;jsessionid=3D676CEB4FC964428007FCD1B1E-FD8E8?sequence=1>
4. Federación Internacional de la Diabetes - IDF. Atlas de la diabetes de la FDI, séptima edición. Bruselas, Bélgica; 2015. Disponible en: <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas>
5. Ministerio de Salud y Protección Social, y Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación - Colciencias. Guía de práctica clínica para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la diabetes mellitus tipo 2 en la población mayor de 18 años, Guía No. GPC-2015-51. Bogotá; 2016. Disponible en: [http://gpc.minsalud.gov.co/gpc\\_sites/Repositorio/Conv\\_637/GPC\\_diabetes/Guia\\_Diabetes\\_Profesionales\\_Tipo\\_2.pdf](http://gpc.minsalud.gov.co/gpc_sites/Repositorio/Conv_637/GPC_diabetes/Guia_Diabetes_Profesionales_Tipo_2.pdf)
6. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harper Bioquímica ilustrada. 28ª edición. México: McGRAW-Hill Interamericana Editores, S.A; 2010. pp. 131-142.
7. American Diabetes Association - ADA. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2011; 34(1):S62-S69. Disponible en: [https://care.diabetesjournals.org/content/34/Supplement\\_1/](https://care.diabetesjournals.org/content/34/Supplement_1/)
8. Asociación Panamericana de Oftalmología - APAO; Programa Visión 2020/IAPB Latinoamérica; Consejo Internacional de Oftalmología - ICO. Actualización de la Guía clínica de Retinopatía Diabética para Latinoamérica. Buenos Aires; 2016. Disponible en: <https://oftalmologos.org.ar/noticias/620-actualizacion-de-la-guia-de-retinopatia-diabetica>.
9. Campuzano-Maya MG; Latorre-Sierra G. La HbA1c en el diagnóstico y en el manejo de la diabetes. *Medicina & Laboratorio*, 2010; 16:211-241. <https://biblat.unam.mx/hevila/Medicinalaboratorio/2010/vol16/no5-6/1>.
10. Miles WR; Root HF. Psychologic tests applied to diabetic patients. *Arch Intern Med*, 1992; 30(6):767-777. <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/article-abstract/534090>
11. Dejgaard A; Gade A; Larsson H; Balle V; Parving A; Parving H. Evidence for diabetic encephalopathy. *Diabet Med.* 1991; 8(2):162-167. <https://onlinelibrary.wiley.com/toc/14645491/1991/8/2>
12. Gaudieri PA; Chen R; Greer TF; Holmes CS. Cognitive function in children with type 1 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes care.* 2008; 31(9):1892-1897. <https://care.diabetesjournals.org/content/31/9/1892.short#aff-1>
13. Lu FP; Lin KP; Kuo HK. Diabetes and the risk of multi-system aging phenotypes: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2009; 4(1), e4144. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004144>
14. Cheng G; Huang C; Deng H; Wang H. Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a meta-analysis of longitudinal studies. *Intern Med J.* 2012; 42(5):484-91. <https://onlinelibrary.wiley.com/toc/14455994/2012/42/5>



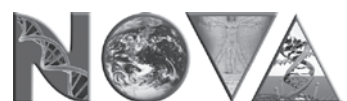
15. Nooyens A; Baan CA; Spijkerman A; Verschuren WM. Type 2 diabetes and cognitive decline in middle-aged men and women: the Doetinchem Cohort Study. *Diabetes Care*. 2010; 33(9):1964-9. <https://care.diabetesjournals.org/content/33/9/1964>
16. Stratton IM; Adler AI; Neil HAW; Matthews DR; Manley SE; Cull CA; et al. Association of glucemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): Prospective observational study. *BMJ*. 2000; 321:405-12. <https://www.bmj.com/content/321/7258/405>
17. Testa R; Bonfigli AR; Prattichizzo F; La Sala L; De Nigris V; Ceriello A. The "Metabolic Memory" Theory and the Early Treatment of Hyperglycemia in Prevention of Diabetic Complications. *Nutrients*. 2017; 9(5):437. <https://www.mdpi.com/2072-6643/9/5/437>
18. Gorska-Ciebiada M; Saryusz-Wolska M; Borkowska A; Ciebiada M; Loba J. (2015). C-Reactive Protein, Advanced Glycation End Products, and Their Receptor in Type 2 Diabetic, Elderly Patients with Mild Cognitive Impairment. *Front. Aging Neurosci*. 2015; 7:209. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2015.00209/full>
19. Ho N; Sommers MS; Lucki I. Effects of Diabetes on Hippocampal Neurogenesis: Links to Cognition and Depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013; 37(8): 1346–1362. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0149763413000705>
20. McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006; 8(4):367–381 <https://www.dialogues-cns.org/contents-8-4/>
21. McNay EC; Recknagel AK. Brain insulin signaling. A key component of cognitive processes and a potential basis for cognitive impairment in type 2 diabetes. *Neurobiol Learn Mem*. 2011; 96(3):432-442. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1074742711001493>
22. Li W; Huang E. An update on type 2 diabetes mellitus as a risk factor for dementia. *J. Alzheimers Dis*. 2016; 53(2): 393-402. <https://www.j-alz.com/vol53-2>
23. Brands AM; Biessels GJ; Kappelle LJ; de Haan EH; de Valk HW; Algra A; et al. Cognitive functioning and brain MRI in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus: a comparative study. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2007; 23(5):343–350. <https://www.karger.com/Article/Abstract/100980>
24. Reijmer YD; Brundel M; de Bresser J; Kappelle LJ; Leemans A; Biessels GJ. (2013). Microstructural White Matter Abnormalities and Cognitive Functioning in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2013; 36(1):137–144. <https://care.diabetesjournals.org/content/36/1/137>
25. Strachan MWJ; Deary IJ; Ewing FME; Frier BM. Is type II diabetes associated with an increased risk of cognitive dysfunction? A critical review of published studies. *Diabetes Care*. 1997; 20(3):438–445. <https://care.diabetesjournals.org/content/20/3/438>
26. American Diabetes Association - ADA. Standards of medical care in diabetes-2017: Summary of Revisions. *Diabetes Care*. 2017; 40(1):S4-S5. [https://care.diabetesjournals.org/content/40/Supplement\\_1/S4](https://care.diabetesjournals.org/content/40/Supplement_1/S4)
27. Federación Internacional de la Diabetes - IDF. IDF Clinical Practice Recommendations for managing Type 2 Diabetes in Primary Care. Bruselas, Belgica; 2017. Disponible en: <https://idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/128:idf-clinical-practice-recommendations-for-managing-type-2-diabetes-in-primary-care.html>
28. Inzucchi SE; Bergenstal RM; Buse JB; Diamant M; Ferrannini E; Nauck M; et al. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centred approach. Update to a Position Statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 2015; 38(1):140–149. <https://care.diabetesjournals.org/content/38/1/140>
29. Sternberg RJ; Sternberg K. *Cognitive Psychology*, Sixth edition. Belmont, California.: Wadsworth, Cengage Learning.; 2012.
30. Neisser U. *Cognitive psychology*. Englewood Cliffs, USA: Prentice-Hall.; 1967.



31. Hyman, I. The rallying cry for the cognitive revolution. En: Neisser U. *Cognitive Psychology: Classic Edition*. New York: Psychology Press; 2014. p. XV-XIX.
32. Neisser U. *Cognitive psychology: Classic Edition*. New York, USA.: Psychology Press.; 2014.
33. Strachan MWJ. R D Lawrence Lecture 2010. The brain as a target organ in Type 2 diabetes: exploring the links with cognitive impairment and dementia. *Diabet Med*. 2011; 28(2):141–147. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1464-5491.2010.03199.x>
34. Ryan CM; Geckle MO; Orchard TJ; Cognitive efficiency declines over time in adults with Type 1 diabetes: effects of micro- and macrovascular complications. *Diabetologia*. 2003; 46(7):940–948. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00125-003-1128-2>
35. Brands AMA; Biessels GJ; de Haan EH; Kappelle LJ; Kessels RP. The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. *Diabetes Care*. 2005;28(3):726–735. <https://care.diabetesjournals.org/content/28/3/726.long>
36. Kodl CT; Seaquist ER. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocr Rev*. 2008; 29(4):494–511. <https://academic.oup.com/edrv/article/29/4/494/2355063>
37. Wrihten SA; Piroli GG; Grillo CA; Reagan LP. A look inside the diabetic brain: Contributors to diabetes-induced brain aging. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1792(5):444–453. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092544390800210X?via%3Dihub>
38. Jacobson AM; Musen G; Ryan CM; Silvers N; Cleary P; Waberski B. Long-term effect of diabetes and its treatment on cognitive function. *N Engl J Med*. 2007; 356(18):1842–52. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa066397>
39. Díaz-Venegas C; Schneider DC; Myrskylä M; Mehra NK. Life expectancy with and without cognitive impairment by diabetes status among older Americans. *PLoS One* [Internet]. 2017 [consultado 30 de marzo de 2018]; 12(12). Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0190488>
40. Fontbonne A; Berr C; Ducimetière P; Alépérovitch, A. Changes in cognitive abilities over a 4-year period are unfavorably affected in elderly diabetic subjects: results of the Epidemiology of Vascular Aging Study. *Diabetes Care*. 2001; 24(2):366–370. <https://care.diabetesjournals.org/content/24/2/366>
41. Van den Berg E; Reijmer YD; de Bresser J; Kessels RP; Kappelle LJ; Biessels GJ; et al. A 4 year follow-up study of cognitive functioning in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2010; 53(1):58–65. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00125-009-1571-9>
42. Velayudhan L; Poppe M; Archer N; Proitsi P; Brown RG; Lovestone S. Risk of developing dementia in people with diabetes and mild cognitive impairment. *Br J Psychiatry*. 2010; 196(1):36–40. <https://www.cambridge.org/core/journals/the-british-journal-of-psychiatry/article/risk-of-developing-dementia-in-people-with-diabetes-and-mild-cognitive-impairment/66FC-681F46B03CBC17AAAE0A6B4E030B>
43. Novik V; García S; Heller F; Mercado J. Influencia de la Diabetes Mellitus tipo 2 en el deterioro cognitivo en un grupo de adultos mayores. *Rev. chil. endocrinol. diabetes*. 2011; 4 (1):13-17. [http://www.revistasoched.cl/1\\_2011/index-1-2011.html](http://www.revistasoched.cl/1_2011/index-1-2011.html)
44. Heidari M; Ghahremanlu H; Haghshenas M; Sadeghi M; Heidari A. Comparison of memory impairments among two groups of patients with diabetes with different disease durations. *BMC Research Notes*. 2012; 5:353. <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/5/353>
45. Pourabbasi A; Tehrani-Doost M; Qavam SE; Farzami J; Larijani B. Evaluation of Cognitive Functions in Iranian Children and Adolescents with Diabetes Mellitus. *Acta Med Iran*. 2017; 55(6):381-388. <https://acta.tums.ac.ir/index.php/acta/article/view/6197>
46. Kern W; Peters A; Fruehwald-Schultes B; Denninger E; Fehm HL. Improving influence of insulin on cognitive functions in humans. *Neuroendocrinology*. 2001; 74(4):270-280. <https://www.karger.com/Article/Abstract/54694>

47. Rudner M; Fransson P; Ingvar M; Nyberg L; Rönnerberg J. Neural representation of binding lexical signs and words in the episodic buffer of working memory. *Neuropsychologia*. 2007; 45(10):2258–2276. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0028393207000772?via%3Dihub>
48. Willette AA; Bendlin BB; Starks EJ; Birdsill AC; Johnson SC; Christian BT. Association of Insulin Resistance with Cerebral Glucose Uptake in Late Middle-Aged Adults at Risk for Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*. 2015; 72(9):1013-1020. <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/2398420>
49. Zhao W; Chen H; Xu H; Moore E; Meiri N; Quon MJ; et al. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J Biol Chem*. 1999; 274(49). <https://www.jbc.org/content/274/49/34893.long>
50. Moran C; Beare R; Phan TG; Bruce DG; Callisaya ML; Srikanth V. Type 2 diabetes mellitus and biomarkers of neurodegeneration. *Neurology*. 2015; 85(13):1123-30. <https://n.neurology.org/content/85/13/1123.long>
51. Moran C; Phan TG; Chen J; Blizzard L; Beare R; Venn A; Srikanth V. Brain atrophy in Type 2 diabetes: regional distribution and influence on cognition. *Diabetes Care*. 2013; 36(12):4036–4042. <https://care.diabetesjournals.org/content/36/12/4036>
52. Qiu C; Sigurdsson S; Zhang Q; Jonsdottir M K; Kjartansson O; Eiriksdottir G; Launer LJ. Diabetes, markers of brain pathology and cognitive function: the age, gene/environment susceptibility-Reykjavik study. *Ann Neurol*. 2014; 75(1):138–146. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4540233/>
53. Callisaya ML; Daly RM; Sharman JE; Bruce D; Davis TME; Greenaway T; et al. Feasibility of a multi-modal exercise program on cognition in older adults with Type 2 diabetes - a pilot randomised controlled trial. *BMC Geriatr*. 2017; 17(1). <https://bmgeriatr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12877-017-0635-9>
54. Kalousová M; Skřha J; Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res*. 2002; 51(6):597-604. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12511184/>
55. Krapfenbauer K; Birnbacher R; Vierhapper H; Herkner K; Kampel D; Lubec G. Glycooxidation, and protein and DNA oxidation in patients with diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)*. 1998; 95(3):331-337. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9730853/>
56. Nowotny K; Jung T; Höhn A; Weber D; Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules*. 2015;5(1):194-222. <https://www.mdpi.com/2218-273X/5/1/194>
57. Sinclair AJ; Girling A J; Bayer A. Cognitive dysfunction in older subjects with diabetes mellitus: impact on diabetes selfmanagement and use of care services. *Diabetes Res Clin Pract*. 2000;50(3):203–212. [https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227\(00\)00195-9/fulltext](https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227(00)00195-9/fulltext)
58. Formiga F; Reñe R; Pérez M. Dementia and diabetes: Casual or Causal Relationship?. *Rev. Med. Clin. (Barc)*. 2015;144(4):176-80. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-clinica-2-linkresolver-demencia-diabetes-relacion-casual-o-S0025775314001195>
59. Dominguez RO; Pagano MA; Marschoff ER; González SE; Repetto MG; Serra JA. Enfermedad de Alzheimer y deterioro cognitivo asociado a la diabetes mellitus tipo 2: relaciones e hipótesis. *Revista de Neurología*. 2014; 29(9):567-572. <https://www.elsevier.es/es-revista-neurologia-295-articulo-enfermedad-alzheimer-deterioro-cognitivo-asociado-S0213485313001552>
60. Roriz-Filho SJ; Sa-Roriz TM; Rosset I; Camozzato AL; Santos AC; Chaves ML; et al. (Pre)diabetes, brain aging, and cognition. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1792(5):432–43. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443908002524?via%3Dihub>
61. You CJ; Liu D; Liu LL; Li GZ. Correlation between acute stroke-induced white matter lesions and insulin resistance. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97(11):e9860. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5882385/>

62. Rundek T; Gardener H; Xu Q; Goldberg RB; Wright CB; Boden-Albala B; et al. Insulin resistance and risk of ischemic stroke among nondiabetic individuals from the northern Manhattan study. *Arch Neurol.* 2010; 67(10):1195–200. <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/801407>
63. Anan F; Masaki T; Kikuchi H; Iwao T; Shimomura T; Umeno Y; et al. Association between plasma highsensitivity C-reactive protein and insulin resistance and white matter lesion in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010; 87(2):233–239. [https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227\(09\)00465-3/fulltext](https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227(09)00465-3/fulltext)
64. Feinkohl I; Aung PP; Keller M; Robertson CM; Morling JR; McLachlan S; et al. Severe hypoglycemia and cognitive decline in older people with type 2 diabetes: The Edinburgh type 2 diabetes study. *Diabetes Care.* 2014; 37(2):507–515. <https://care.diabetesjournals.org/content/37/2/507.long>
65. Colberg SR; Somma CT; Sechrist SR. Physical Activity Participation May Offset Some of the Negative Impact of Diabetes on Cognitive Function. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* 2008; 9(6):434–438. [https://www.jamda.com/article/S1525-8610\(08\)00121-7/fulltext](https://www.jamda.com/article/S1525-8610(08)00121-7/fulltext)
66. Blondell SJ; Hammersley-Mather R; Veerman JL. Does physical activity prevent cognitive decline and dementia A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *BMC Public Health.* 2014; 14(510). <https://bmcpublichealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2458-14-510>
67. Hernández RJ; Domínguez YA; Mendoza-Choqueticlla J. Efectos benéficos del ejercicio físico en las personas con diabetes mellitus tipo 2. *Rev. Cuba. Endoc.* 2018; 29(2):1–18. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=84725>



**NOVA Publicación Científica  
en Ciencias Biomédicas**

# Enfermedades hematológicas y no hematológicas relacionadas con el fenotipo ABO en pacientes de una unidad hospitalaria de Medellín

Hematological and non-hematological diseases related to the ABO phenotype in patients at a medellín hospital unit

Villa Palacio María Isabel<sup>1</sup>, Claudia María Cuervo Araque<sup>2</sup>, Rodríguez Palacios Karime<sup>3</sup>

## Resumen

**Introducción.** El sistema sanguíneo ABO está compuesto por los antígenos A y B, los cuales varían de acuerdo a las sustituciones de nucleótidos, que determinan la especificidad de la enzima para la cual codifican. Su importancia clínica se extiende más allá de los procesos transfusionales, aparentemente está involucrado en la fisiopatología de varias enfermedades, como cáncer, infecciones, alteraciones cardiovasculares, entre otras. **Metodología.** estudio descriptivo retrospectivo, con 2708 datos de clasificación de grupo sanguíneo ABO en pacientes hospitalizados. Se realizó la prueba de Chi<sup>2</sup> de independencia para determinar la relación entre enfermedades hematológicas y no hematológicas y el grupo sanguíneo. **Resultados.** El grupo sanguíneo O se presentó en el 59,2% y el AB en el 18% de los pacientes; las entidades clínicas que predominaron fueron las no hematológicas; entre ellas las más frecuentes la hemorragia gastrointestinal, diabetes mellitus y las fracturas tanto para el grupo A como el B. En el grupo AB se presentó la tuberculosis y hemorragia gastrointestinal. Para las enfermedades de la sangre y de los órganos hematopoyéticos,

1. Microbióloga y Bioanalista, magister en Microbiología y Bioanálisis en la línea Inmunohematología y banco de sangre. Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia. Área Hematología.

Correo electrónico: mariaisabelv@colmayor.edu.co

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8645-692X>

CvLAC: [http://scienti.colciencias.gov.co:8081/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod\\_rh=0001402430](http://scienti.colciencias.gov.co:8081/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0001402430)

2. Magister en Epidemiología. Docente. Grupo de investigación Biociencias. Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia.

Correo electrónico: ccuervo@colmayor.edu.co.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4133-7422>

CvLAC: [https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod\\_rh=0000259500](https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000259500)

3. Estudiante de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia.

Correo electrónico: karime0620@hotmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1749-8573>

CvLAC : <https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/EnRecursoHumano/inicio.do>

Correo electrónico de correspondencia: mariaisabelv@colmayor.edu.co

en los grupos sanguíneos A, AB y O predominó la anemia de tipo no especificada, por su parte en el grupo B se presentó la anemia falciforme en crisis. **Conclusión.** en el presente estudio no se pudo establecer desde el análisis estadístico la relación entre los antígenos de grupo sanguíneo y el desarrollo de una entidad clínica en particular, pero desde el punto de vista clínico si se pudo notar la tendencia de una frecuencia más alta de una enfermedad en un grupo sanguíneo específico.

**Palabras claves:** grupo sanguíneo, enfermedades, hematológica, antígenos.

### *Abstract*

**Introduction.** The ABO blood system is composed of A and B antigens, which vary according to nucleotide substitutions, which determine the specificity of the enzyme for which they code. Its clinical importance extends beyond transfusion processes, apparently it is involved in the pathophysiology of various diseases, such as cancer, infections, cardiovascular disorders, among others. **Methodology.** retrospective descriptive study, with 2708 ABO blood group classification data in hospitalized patients. The Chi2 test of independence was performed to determine the relationship between hematological and non-hematological diseases and blood group. **Results.** Blood group O was present in 59.2% and AB in 18% of the patients; the clinical entities that predominated were non-hematological ones; Among them the most frequent were gastrointestinal bleeding, diabetes mellitus and fractures for both group A and B. In group AB, tuberculosis and gastrointestinal bleeding occurred. For diseases of the blood and hematopoietic organs, anemia of unspecified type predominated in blood groups A, AB and O, while in group B there was sickle cell anemia in crisis. **Conclusion.** in the present study, the relationship between blood group antigens and the development of a particular clinical entity could not be established from the statistical analysis, but from the clinical point of view, the trend of a higher frequency could be observed. of a disease in a specific blood group.

**Keywords:** blood group, diseases, hematological, antigens.



## Introducción

El sistema de grupo sanguíneo ABO fue descubierto por Karl Landsteiner hace más de 100 años y hasta ahora sigue siendo el más importante desde el punto de vista inmunohematológico. Está compuesto por los antígenos A y B, que dan origen a cuatro tipos de grupos sanguíneos, determinados por el gen ABO ubicado en el cromosoma 9, posee tres alelos A, B y O, los cuales varían de acuerdo a las sustituciones de nucleótidos, que determinan la especificidad de la enzima para la cual codifican (1). El alelo A codifica para la enzima transferasa A que cataliza la adición de un residuo de N- acetilgalactosamina (GalNac) al antígeno H, generando el antígeno A; el alelo B codifica para la enzima transferasa B, esta adiciona un residuo de D – Galactosa (Gal) formando el antígeno B; finalmente el alelo O presenta sólo una diferencia con el antígeno A y es la delección de una guanina (G) generando un cambio en el marco de lectura, el cual produce una proteína sin actividad transferasa. Adicionalmente se encuentra el gen Se, ubicado en el cromosoma 19, el cual codifica para una fucosiltransferasa que se expresa en el tejido de los secretores, permitiendo la expresión de los antígenos no sólo en la membrana de las células rojas, sino también en una variedad de células y tejidos humanos, incluido el epitelio sensorial neuronas, plaquetas, glándulas salivares, tracto respiratorio, gastrointestinal, endotelio vascular, entre otros (2-4). Por lo anterior la importancia clínica del grupo sanguíneo ABO se extiende más allá de la Inmunohe-

matología y los procesos transfusionales, aparentemente el sistema está involucrado en la fisiopatología de varias enfermedades en humanos, entre ellas las neoplasias como el cáncer gástrico, pancreático, de ovario y colo rectal; trastornos infecciosos como los generados por *Escherichia coli* y *Helicobacter pylori* (5), enfermedades cardiovasculares como la enfermedad coronaria, tromboembolismo venoso, enfermedades reumáticas, entre otras(6, 7). En este sentido el presente trabajo pretende describir la relación existente entre el grupo sanguíneo ABO y las enfermedades tanto hematológicas como no hematológicas de la población de pacientes transfundidos en un Hospital de la Ciudad de Medellín.

## Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo, con 2708 resultados obtenidos de la clasificación del grupo sanguíneo ABO en pacientes hospitalizados en una unidad hospitalaria de la ciudad de Medellín en el período 2016-2018. Se tuvieron en cuenta factores sociodemográficos como edad, sexo, grupo sanguíneo, entidad clínica de ingreso y que tuvieran una historia clínica en la unidad hospitalaria en donde se realizó el estudio. Se gestionaron los permisos necesarios ante el comité de investigaciones del hospital para poder acceder a la información de las historias clínicas. En cuanto a los aspectos éticos de la investigación se consideró según la Declaración

de Helsinki y la Resolución número 8430 DE 1993 de Colombia, como una investigación sin riesgo.

Se creó una base de datos en Excel con la información obtenida de las historias clínicas, se utilizó, además el programa SPSSv25 para el análisis estadístico, determinando para las variables cualitativas frecuencias absolutas y porcentajes. Para la variable edad se determinó su normalidad por la prueba de Kolmogorov Smirnov. Por último, se exploró por medio de la prueba de Chi2 de independencia la relación entre enfermedades hematológicas y no hematológicas con la presencia de algún grupo sanguíneo. Se tomó como significancia estadística un valor de  $p < 0,05$ .

## Resultados

La población estudiada fue de 2708 pacientes, de los cuales el 52,3% (1418) correspondieron a población femenina y 47,7% (1290) a población masculina. La edad no presentó distribución normal según la prueba de Kolmogorov Smirnov, con un valor de  $p=0,000$ . La mediana de edad de la población fue de 59 años. La mediana de edad para las mujeres fue 57 y para hombres 61 años. El grupo sanguíneo O se presentó en el 59,2% (1763) de los pacientes, siendo el más frecuente en el grupo estudiado. Por su parte el grupo AB fue el que se observó en menor porcentaje, representando el 18% (55) de la población. Para el sistema Rh se

observó un fenotipo positivo en el 91,7% (2730) y negativo en el 8,3% (246) de los individuos estudiados. Tabla 1

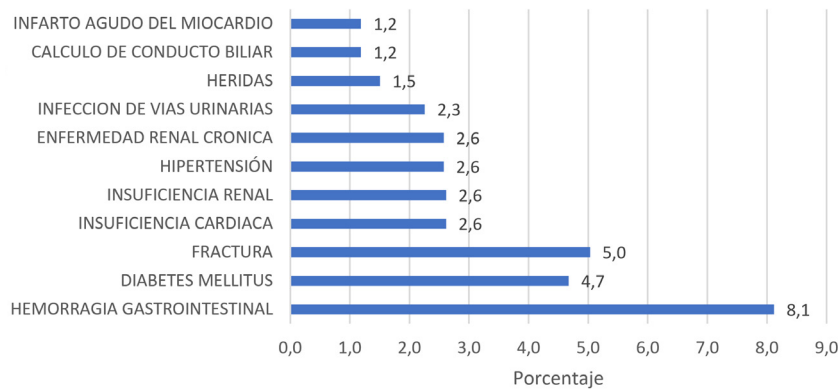
**Tabla 1.** Distribución de la clasificación Rh en cada grupo sanguíneo.

Grupo Sanguíneo	Clasificación Rh	
	Positivo	Negativo
	# (%)	# (%)
O	1619 (91,8)	144 (8,2)
A	823 (90,8)	83 (9,2)
B	235 (93,3)	17 (6,7)
AB	53 (96,4)	2 (3,6)

Con relación a las entidades clínicas, predominaron las entidades no hematológicas en el 84,8% (2525) de la población, el 15,2% (451) restante se clasificó en el grupo de las enfermedades hematológicas.

Las enfermedades no hematológicas más frecuentes fueron la hemorragia gastrointestinal 8,1% (205) casos, Diabetes mellitus 4,7% (118) y las fracturas 5% (127) casos. Se presentaron otras enfermedades en menor frecuencia como puede observarse en la figura 1.

**Figura 1.** Frecuencia de las enfermedades no hematológicas.

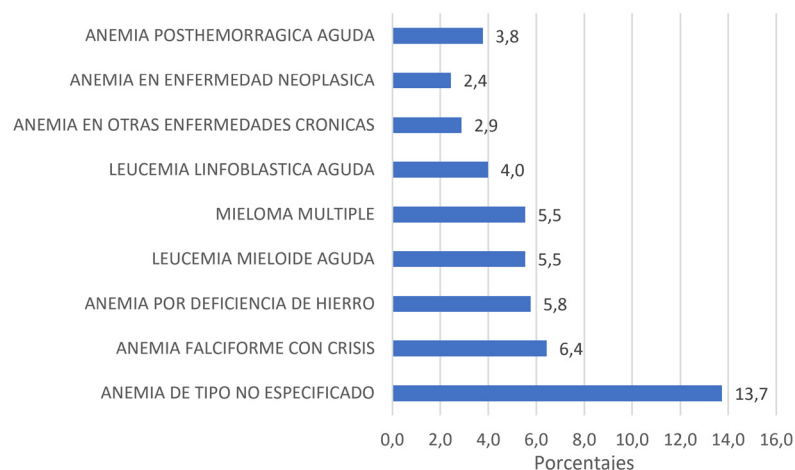


**Fuente:** Elaboración propia.

De otro lado, las enfermedades de la sangre y de los órganos hematopoyéticos, se presentaron en el 15,2% (451) de los individuos; en este grupo la anemia representó el 46,2% (208), principalmente la anemia de tipo no especificado, que se observó en el 13,7% (62) de los individuos; las anemias

nutricionales, como la anemia por deficiencia de hierro reportada en el 5,8% (26) de la población, las causadas por hemólisis como la anemia falciforme con crisis 6,4% (29), resto de las enfermedades se pueden observar en la figura 2.

**Figura 2.** Frecuencia de las enfermedades hematológicas.



**Fuente:** Elaboración propia.

Al realizar el análisis de relación de independencia entre grupo sanguíneos y tipo de enfermedad, la prueba de Chi<sup>2</sup> tuvo un

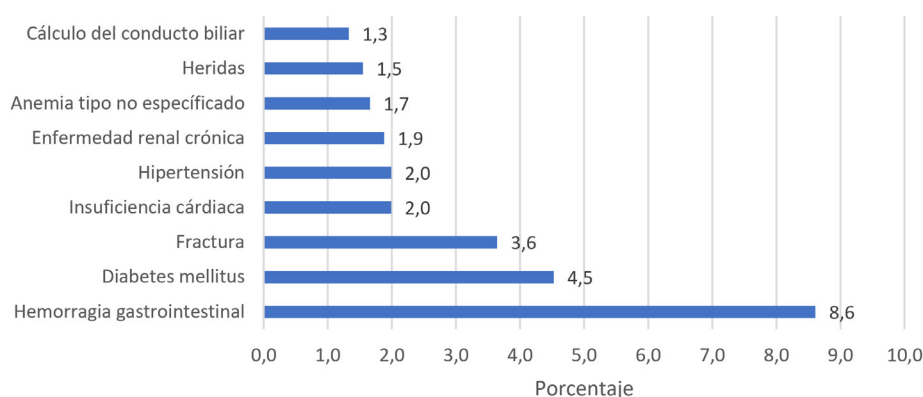
valor de  $p > 0,05$ . Lo que indica que no existe relación entre estas dos variables.

### **Grupos sanguíneos y frecuencia de enfermedades en general en los pacientes estudiados**

En el grupo de personas que tenían grupo sanguíneo A, entre las enfermedades que se observaron con mayor frecuencia está la hemorragia gastrointestinal un 8,6% (78),

Diabetes mellitus 4,5% (41) y las fracturas 3,6% (33). En la figura 3 se observan otras de las enfermedades que se presentaron con mayor frecuencia.

**Figura 3.** Enfermedades más frecuentes en el grupo sanguíneo A.

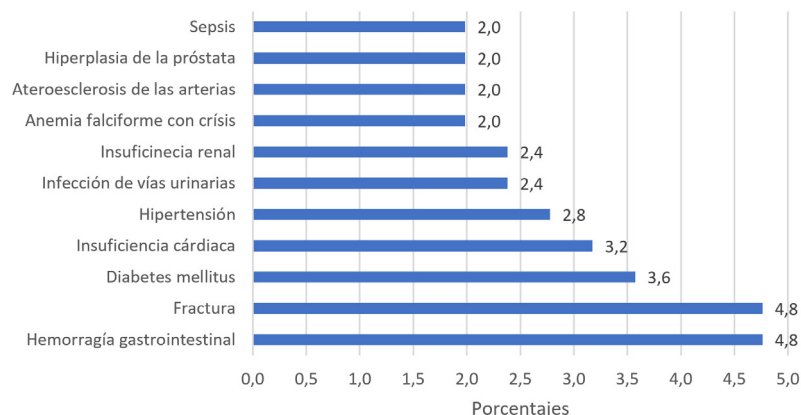


Fuente: Elaboración propia.

En el grupo sanguíneo B, las enfermedades más frecuentes fueron similares a las del grupo A, aunque con frecuencias diferentes. Se observó la hemorragia gastrointestinal,

las fracturas y la diabetes mellitus con un 4,8% (12), 4,8% (12) y 3,6% (9) respectivamente. Figura 4.

**Figura 4.** Enfermedades más frecuentes en el grupo sanguíneo B.

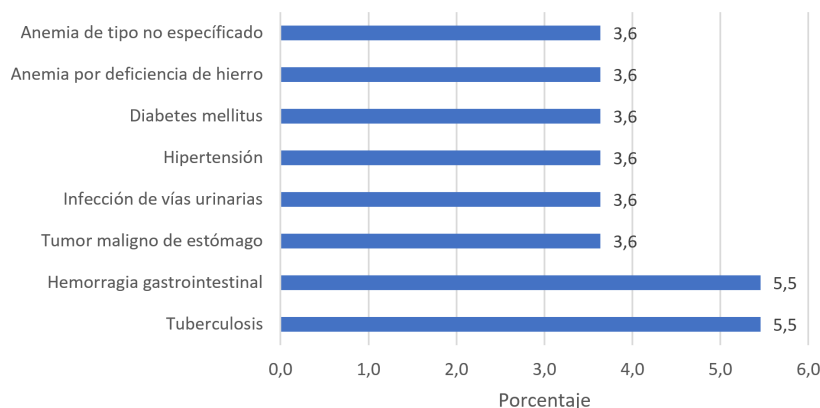


Fuente: Elaboración propia.

En el grupo sanguíneo AB las enfermedades más frecuentes fueron Tuberculosis y hemorragia gastrointestinal, con 5,5% (3) cada

una y tumor maligno de estómago e infección de vías urinarias con un 3,6% (2) cada una. Figura 5.

**Figura 5.** Enfermedades más frecuentes en el grupo sanguíneo AB.

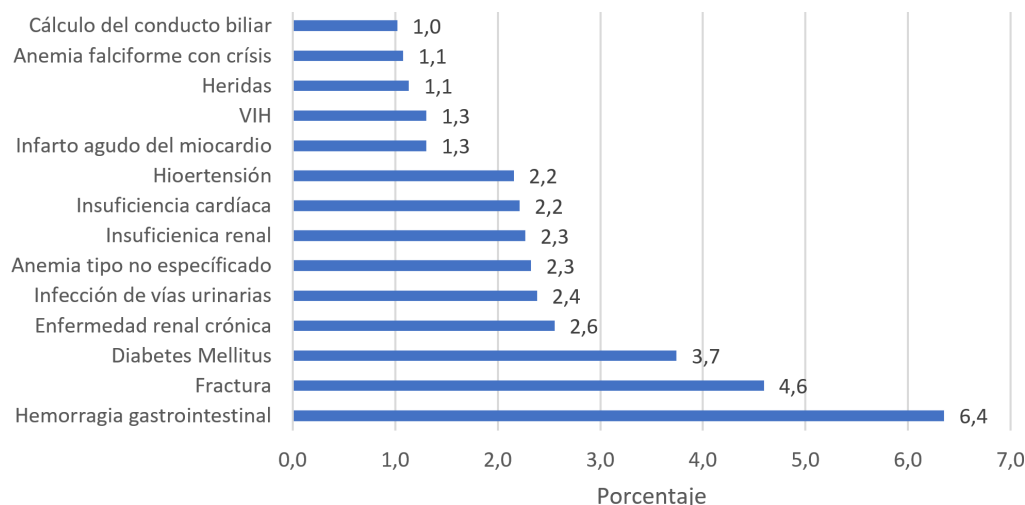


**Fuente:** Elaboración propia.

Para el grupo sanguíneo O las enfermedades fueron Hemorragia gastrointestinal, Fracturas, diabetes mellitus y enfermedad

renal crónica con una frecuencia del 6,4% (112), 4,6% (81), 3,7 (66) y 2,6 (45) respectivamente. Figura 6.

**Figura 6.** Enfermedades más frecuentes en el grupo sanguíneo O.



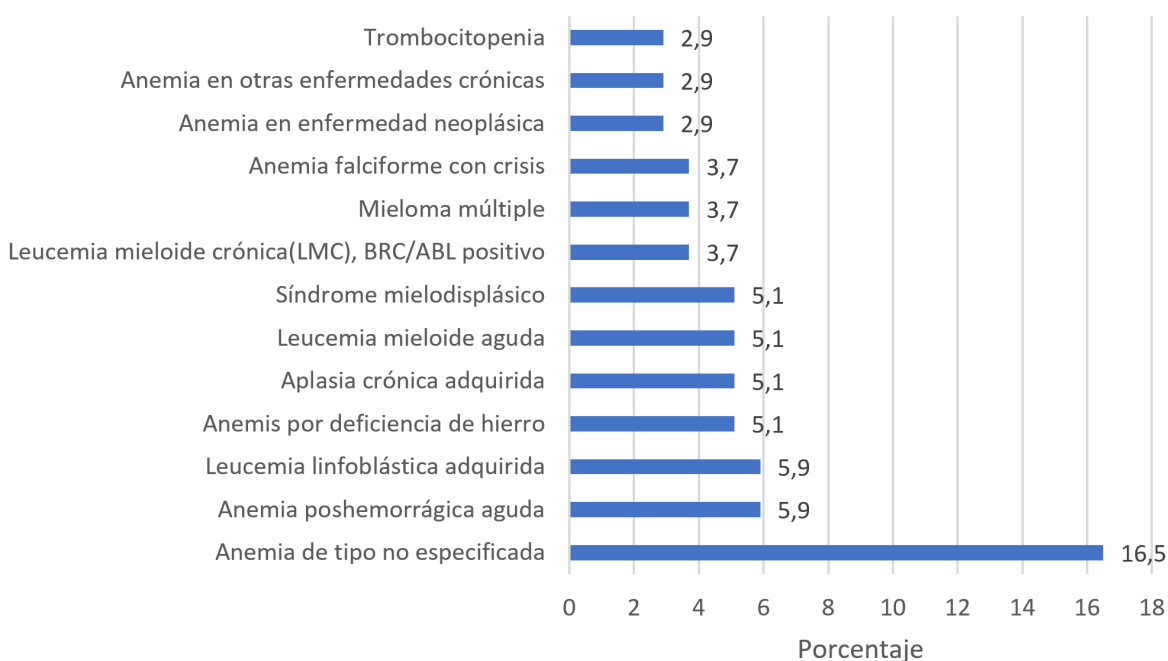
**Fuente:** Elaboración propia.

### ***Frecuencia de las enfermedades hematológicas en los diferentes grupos sanguíneos***

Las enfermedades hematológicas más frecuentes en el grupo sanguíneo A fueron anemia tipo no especificada con un 16,5% (17), anemia pos hemorrágica aguda y leucemia linfoblástica aguda un 5,9% (8) cada una, y anemia por deficiencia de hierro,

aplasia crónica adquirida, leucemia mieloide aguda y el síndrome mielodisplásico en un 5,1% (7) cada uno. En la figura 7 se observa la distribución de las enfermedades hematológicas más frecuentes en este grupo sanguíneo.

**Figura 7.** Enfermedades hematológicas más frecuentes en el grupo sanguíneo A.



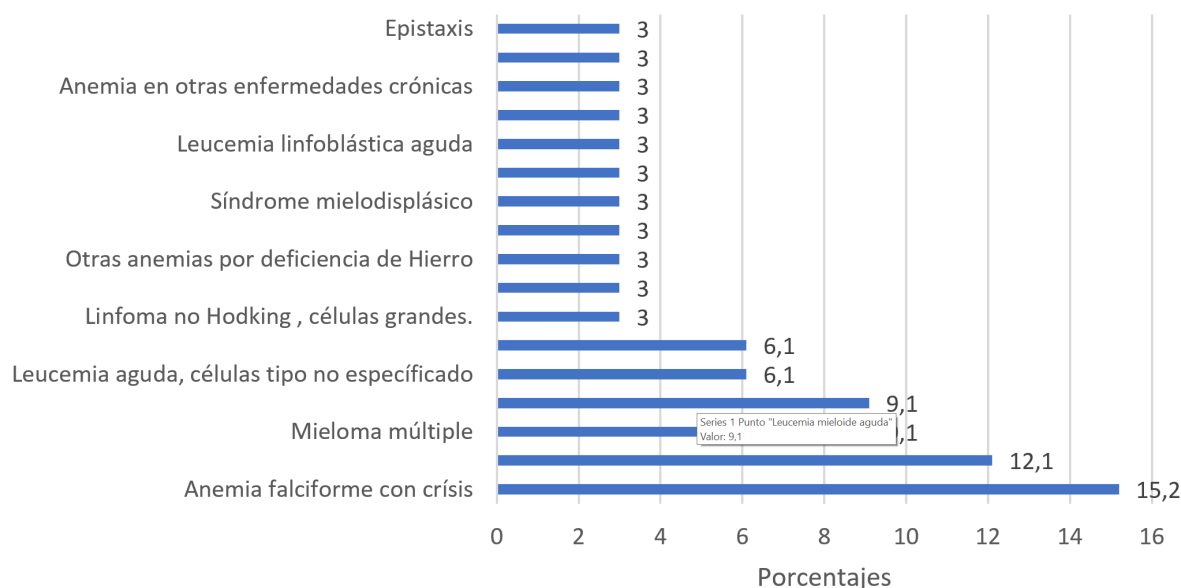
**Fuente:** Elaboración propia.

En el grupo sanguíneo B las enfermedades hematológicas más frecuentes fueron anemia falciforme con crisis, anemia tipo no especificado, mieloma múltiple y leucemia

mieloide aguda presentes en un 15,2% (5), 12,1% (4), 9,1% (3) y 9,1% (3) respectivamente. Figura 8.



**Figura 8.** Enfermedades hematológicas más frecuentes en el grupo sanguíneo B.

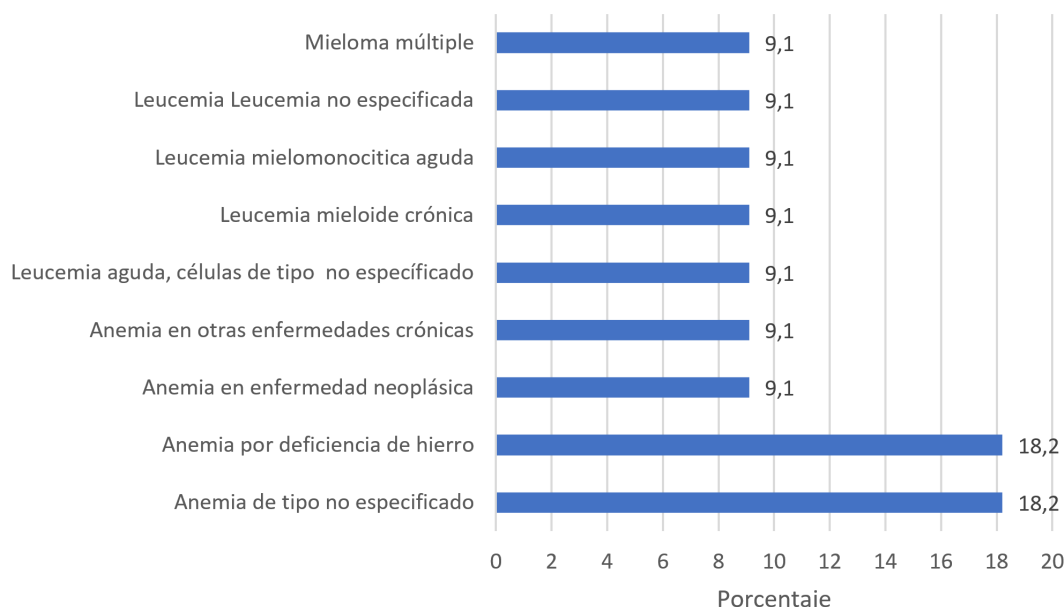


**Fuente:** Elaboración propia.

En el grupo sanguíneo AB las enfermedades hematológicas fueron la anemia de tipo no especificado y la leucemia aguda de tipo no especificado en un 18,2% (2) cada una,

Anemia en enfermedad neoplásica y la anemia en enfermedades crónicas 9,15% (1) en cada una. Figura 9.

**Figura 9.** Enfermedades hematológicas más frecuentes en el grupo sanguíneo AB.

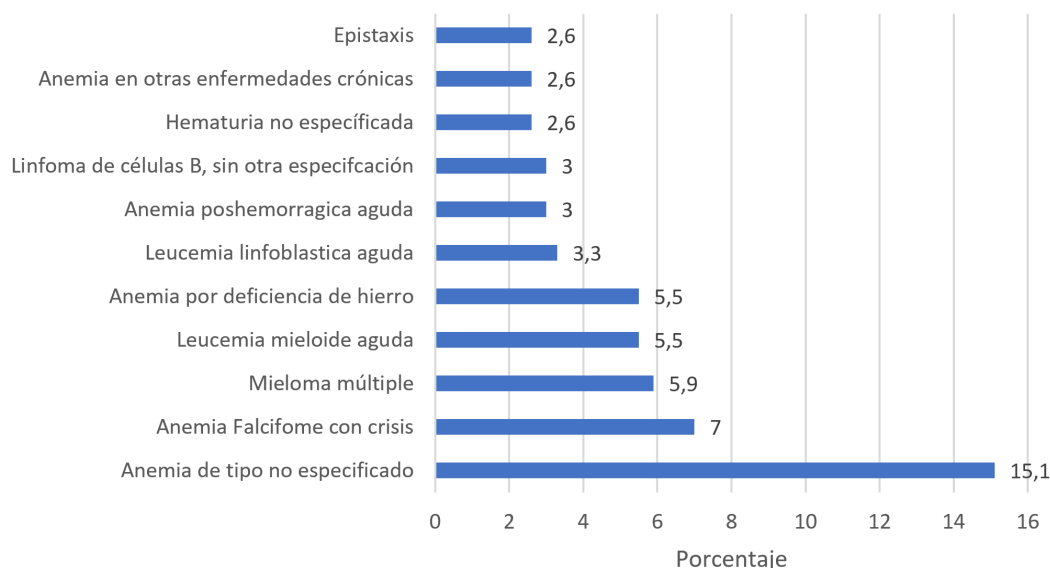


**Fuente:** Elaboración propia.

En el grupo sanguíneo O las enfermedades hematológicas más frecuentes fueron: Anemia de tipo no especificado en un 15,1%

(41), anemia falciforme con crisis 7% (19) y el mieloma múltiple 5,9% (16), el resto de enfermedades se pueden ver en figura 10.

**Figura 10.** Enfermedades hematológicas más frecuentes en el grupo sanguíneo O.



**Fuente:** Elaboración propia.

## Discusión

El grupo sanguíneo que predominó en la población estudiada fue el O con un 58.9%, por su parte el grupo AB estuvo representado en el menor porcentaje de la población encontrándose expresado sólo en el 18%; lo que representa un comportamiento similar a los hallazgos de estudios realizados tanto en el ámbito nacional como internacional donde se reportan frecuencias del grupo O superiores al 58% (8, 9) y del grupo AB menores al 5% (10).

Con relación a las condiciones clínicas de los pacientes estudiados, específicamente el

haber sido transfundidos, se encontró que las entidades clínicas no hematológicas predominaron en la población en un 84.8%, con una frecuencia significativa de hemorragia gastrointestinal, diabetes y fracturas. De las entidades anteriores con la que se han realizado estudios dirigidos a establecer la posible relación entre la presentación de la enfermedad y el grupo sanguíneo ABO que poseen, es con la diabetes, la forma más frecuente de diabetes es la tipo 2 (85-90%) y se caracteriza porque es casi exclusiva de adultos, aunque actualmente se puede desarrollar en niños y adolescentes. El estudio de Fagherazzi et al planteó que los individuos con antígenos A y B tienen un riesgo mayor de desarrollar diabetes mellitus tipo 2

en comparación con aquellos que eran grupo O; en las personas con grupo sanguíneo AB la determinación de esta relación no tuvo relevancia estadística (11). De otro lado Huidobro *et al.*, sugieren una asociación negativa entre la presencia del antígeno B del grupo ABO y el desarrollo de diabetes gestacional, considerando la presencia del antígeno B como un marcador negativo (12, 13). Los resultados del presente estudio concuerdan con los hallazgos mencionados, ya que se encontró una prevalencia de diabetes mayor en los pacientes con grupos sanguíneos A y B; sin embargo, es importante considerar que el tipo de enfermedad no siempre está asociada con la necesidad de una terapia transfusional, lo que en este caso podría sesgar la cantidad de pacientes analizados y así mismo la frecuencia de los grupos sanguíneos reportada.

Así mismo a través del tiempo se han postulado los antígenos del sistema ABO como un factor de riesgo para diversas enfermedades cardiovasculares, principalmente aquellas asociadas con complicaciones trombóticas (2, 14, 15). El mecanismo propuesto para explicar esta relación subyace en el posible efecto regulador de los antígenos ABO sobre los niveles plasmáticos del factor Von Willebrand (VWF) y el factor VIII de la coagulación VIII (FVIII). La presencia de abundantes moléculas de carbohidratos ABH en las cadenas de oligosacáridos del FVW proporcionan el principal mecanismo regulador por parte del sistema ABO al FVW. Las enzimas glucosiltransferasa activas de los antígenos A y B encontradas en

el aparato de Golgi de las células endoteliales generan modificaciones a los carbohidratos del FVW, que pueden influir en los niveles circulantes de este y en su función por medio de varios mecanismos que han sido planteados, entre ellos, alteración de la tasa de síntesis y/o secreción del FVW, la regulación de su proteólisis inducida principalmente por la proteína ADAMTS13, la modulación del aclaramiento del FvW, o cambiando la actividad biológica del FVW (5, 14, 16, 17). Sumado a lo anterior se ha planteado la asociación de polimorfismos ABO y el desarrollo de enfermedades cerebrovasculares (18). En la población de estudio la principal enfermedad asociada con alteraciones cardiovasculares fue la insuficiencia cardíaca, que según el grupo sanguíneo se presentó con mayor frecuencia en los pacientes grupo O, y aunque se haya planteado que los grupos No-O tienen mayor predisposición a estas (15), en nuestro país como se mencionó anteriormente alrededor del 58% de la población hacen parte de este fenotipo, razón por la cual se dificultó poder confirmar la hipótesis (8).

Otra enfermedad en la cual se ha sugerido la posible relación con la presencia de los antígenos de grupo sanguíneo, es el cáncer de páncreas y puede deberse a la naturaleza bioquímica de los antígenos y a que su expresión se observa en varios tipos de tejidos diferentes a los glóbulos rojos, entre ellas las células del tracto gastrointestinal (18, 19). Investigaciones han evidenciado que las células de pacientes con cáncer pancreático expresan antígenos de grupos

sanguíneos en su superficie celular y tienen diferentes patrones de expresión; sugiriendo que las modificaciones a la especificidad de glucosiltransferasa ocurren durante tumorigénesis pancreática (7). De otro lado en la infección por *Helicobacter pylori*, un rasgo determinado genéticamente con expresión polimórfica conocida entre individuos y poblaciones que ha atraído interés como posible factor de riesgo pertenece al grupo sanguíneo ABO (20) y el potencial papel de los antígenos de este sistema como receptores de toxinas, parásitos y bacterias, que pudieran facilitar los mecanismos de colonización ó invasión de estos. Algunos estudios han sugerido que las personas grupo O presentan un mayor riesgo de adquirir infección por *Helicobacter pylori* (21, 22).

Como se puede observar en el presente estudio varias de las enfermedades en las que entre los factores para su desarrollo están los antígenos de grupo sanguíneo, no se encontraron en la población, posiblemente porque no son entidades que frecuentemente requieran soporte transfusional. Para las otras enfermedades clasificadas en este grupo y de acuerdo a la literatura estudiada no se ha planteado una posible asociación entre el desarrollo de la enfermedad y la presencia del algún fenotipo, sugiriendo la necesidad de proponer nuevos procesos de investigación que puedan determinar marcadores asociados con el riesgo de presentar una condición clínica particular.

De otro lado en el grupo de las enfermedades de la sangre y de los órganos hema-

topoyéticos, la anemia fue la entidad más frecuente, la de tipo no especificado representó el mayor porcentaje en todos los grupos sanguíneos a excepción del grupo B, generalmente es una anemia secundaria a una condición clínica específica que genera la disminución en los valores de hemoglobina y que dependiendo de su expresión clínica requiere soporte transfusional como opción terapéutica (23). En los individuos grupo B predominó la anemia falciforme, anemia hemolítica heredada de manera autosómica recesiva caracterizada por la presencia de la Hb S, predomina, pero no es exclusiva de la raza negra, encontrándose con mayor frecuencia en el África subsahariana y descendientes afro americanos (24), poblaciones que una frecuencia de grupo sanguíneo B más alta que en otros grupo étnicos (25) (26). Entre las neoplasias más frecuentes en la población se encontraron la leucemia linfóide aguda, leucemia mieloide aguda y mieloma múltiple, una de las posibles razones de este hallazgo es que son entidades que normalmente presentan disminución en la producción de otras líneas celulares, generando anemia y con frecuencia trombocitopenia marcada que suscitan la necesidad de trasfusión sanguínea (27, 28). De acuerdo a la literatura científica revisada no se ha planteado una posible asociación entre el diagnóstico de estas entidades y el fenotipo de grupo sanguíneo ABO presente.

Finalmente, en el presente estudio no se pudo establecer desde la parte estadística la relación entre los antígenos de grupos sanguíneos y el desarrollo de una entidad clíni-

ca en particular, pero desde el punto de vista clínico si se puede notar la tendencia de una frecuencia más alta de una enfermedad en un grupo sanguíneo. Varios son los aspectos a considerar, uno de ellos la baja frecuencia de cada una de las enfermedades diagnosticadas en el grupo de pacientes estudiados y de otro lado, la población estudiada ya que sesga la descripción, en este caso particular fueron aquellos pacientes que requirieron de terapia transfusional, lo que pudo limitar el número de enfermedades a estudiar y el análisis de aquellas que según la literatura se ha propuesto una asociación.

*Agradecimientos:* a la estudiante Maria Isabel Monsalve por su participación durante la recolección y análisis de la información.

## Referencias

1. Zhai. González-Ordóñez ÁJ. Grupos sanguíneos y enfermedad. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2005; 125(10):382–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1157/13079179>
2. Anstee DJ. The relationship between blood groups and disease. *Blood*. 2010;115(23):4635–43. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-261859>
3. Arbeláez- García C. Sistema de grupo sanguíneo ABO. *Med Lab* [Internet]. 2009;15(7):329–47. Available from: <https://www.medigrafix.com/pdfs/medlab/myl-2009/myl097-8c.pdf>
4. Franchini, Massimo and Liumbruno GM. “ABO blood group: old dogma, new perspectives.” *Clin Chem Lab Med*. 2013;51(8):1545–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23648637/DOI: 10.1515/cclm-2013-0168>
5. Zhang H, Mooney CJ, Reilly MP. ABO blood groups and cardiovascular diseases. *Int J Vasc Med*. 2012;2012. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23133757/> DOI: 10.1155/2012/641917
6. Edgren G, Hjalgrim H, Rostgaard K, Norda R, Wilkman A, Melbye M, et al. Risk of gastric cancer and peptic ulcers in relation to ABO blood type: A cohort study. *Am J Epidemiol*. 2010;172(11):1280–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20937632/> DOI: 10.1093/aje/kwq299
7. Wolpin BM, Chan AT, Hartge P, Chanock SJ, Kraft P, Hunter DJ, et al. ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(6):424–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19276450/> DOI: 10.1093/jnci/djp020
8. JAIME C-F. Frecuencia de los grupos sanguíneos ABO y Rh en la población laboral del valle de Aburrá y del cercano oriente de Antioquia (Colombia). *Acta Médica Colomb* [Internet]. 2006;31(1):20–30. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/1631/163114147009.pdf>
9. Del Peón-Hidalgo L, Pacheco-Cano MG, Zavala-Ruiz M, Madueño-López A, García-González A. Frecuencias de grupos sanguíneos e incompatibilidades ABO y RhD, en La Paz, Baja California Sur, México. *Salud Publica Mex*. 2002;44(5):406–12. Available from: <http://www.insp.mx/salud/index.html>
10. Pérez Escobar, Rocío, Betancur Ceballos, Carolina, López Mendoza, Andrea, Saavedra Perea, Juana, Ríos Osorio L. Frecuencia de los principales grupos sanguíneos del sistema ABO y el factor Rh en seis municipios del área rural del departamento de Antioquia y el Atrato Medio, Colombia, 2005. *Hechos Microbiol*. 2010;1(2):27–33. Available from: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/hm/article/view/9548>
11. Fagherazzi G, Gusto G, Clavel-Chapelon F, Balkau B, Bonnet F. ABO and Rhesus blood groups and risk of type 2 diabetes: evidence from the large E3N cohort study. *Diabetologia*. 2015;58(3):519–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25533388/> DOI: 10.1007/s00125-014-3472-9

12. Huidobro Muñoz A, Torres C. D, Paredes F. Diabetes Gestacional: Asociación con grupo ABO. *Rev Med Chil.* 2017;145(4):431–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872017000400002>
13. Li X, Xu H, Gao P. ABO Blood Group and Diabetes Mellitus Influence the Risk for Pancreatic Cancer in a Population from China. 2018;9392–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6320638/doi:10.12659/MSM.913769>
14. Biswas S, Ghoshal PK, Halder B, Mandal N. Distribution of ABO blood group and major cardiovascular risk factors with coronary heart disease. *Biomed Res Int.* 2013;2013. Available from: <https://doi.org/10.1155/2013/782941>
15. Vasan SK, Rostgaard K, Majeed A, Ullum H, Titledstad KE, Pedersen OBV, et al. ABO Blood Group and Risk of Thromboembolic and Arterial Disease: A Study of 1.5 Million Blood Donors. *Circulation.* 2016;133(15):1449–57. Available from: DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017563
16. Franchini M, Lippi G. The intriguing relationship between the ABO blood group, cardiovascular disease, and cancer. *BMC Med.* 2015;13(1):1–3. Available from: DOI <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0250-y>
17. Chowdhary S, Sharma V, Chowdhary S. Study of association of ABO blood group with ischemic heart disease. *Int J Med Sci Public Heal.* 2016;5(3):468. Available from doi: 10.5455/ijmsph.2016.0408201584
18. Li Y, Liu L, Huang Y, Zheng H, Li L. Association of ABO polymorphisms and pancreatic Cancer/ Cardiocerebrovascular disease: A meta-Analysis. *BMC Med Genet.* 2020;21(1):1–10. Available from: doi: 10.1186/s12881-020-0975-8
19. Tanaka Y, Kumagi T, Terao T, Kuroda T, Yokota T, Yukimoto A, et al. ABO Blood Type and the Long-term Outcomes of Pancreatic Cancer. 2020;761–8. Available from: doi: 10.2169/internalmedicine.3748-19
20. Nakao M, Matsuo K, Ito H, Shitara K, Hosono S, Watanabe M. ABO Genotype and the Risk of Gastric Cancer , Atrophic Gastritis , and Helicobacter pylori Infection. 2011;1665–73. Available from: DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-11-0213
21. Chakrani Z, Robinson K, Taye B. Association Between ABO Blood Groups and Helicobacter pylori Infection: A Meta-Analysis. *Sci Rep [Internet].* 2018;8(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-36006-x>
22. Press D. Relation between ABO blood groups and Helicobacter pylori infection in symptomatic patients. 2011;221–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3190290/doi:10.2147/CEG.S23019>
23. Lawrence Tim Goodnough, MDa B, Anil K. Panigrahi, MD, PhDa C. Blood Transfusion Therapy. *Med Clin North Am.* 2017;101(2):431–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28189180/DOI:10.1016/j.mcna.2016.09.012>
24. Quintero M, M.D. Jimenez M. Anemia de células falciformes m. *Rev Gastrohnp.* 2012;14(2):27–35. Available from: <https://revgastrohnp.univalle.edu.co/a12v14n2s1/a12v14n2s1art4.pdf>
25. Salomón-Cruz J, Gómez-Valencia L, Morales-Hernández A. Estudio clínico y genético de tres casos de anemia de células falciformes. *Salud en Tabasco.* 2006;12(2):440–2. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/487/48712206.pdf>
26. Fong C, Menzel S, Lizarralde MA, Barreto G. Genetic variants associated with fetal hemoglobin levels show the diverse ethnic origin in Colombian patients with sickle cell anemia. *Biomedica.* 2015;35(3):437–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i3.2573>
27. Pelcovits A, Niroula R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. *R I Med J (2013) [Internet].* 2020;103(3):38–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32236160>
28. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: A comprehensive review and 2016 update.' *Blood Cancer J.* 2016;6(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27367478/doi:10.1038/bcj.2016.50>



# Prevalencia de resistencia de bacteria aisladas en hemocultivos, en un hospital universitario de Colombia

Prevalence of bacterial resistance isolated in hemocultives, in a university hospital of Colombia

Marlene Duran-Lengua<sup>1</sup>, Luis Valladales-Restrepo<sup>2</sup>, Roger Caraballo-Marimón<sup>3</sup>,  
Geraldine Romero Martínez<sup>4</sup>, Adrián Cabarcas-Tovar<sup>5</sup>, Cristina Bohórquez Moreno<sup>6</sup>

## Resumen

**Objetivo.** Describir la frecuencia de los microorganismos y la resistencia antibiótica de bacterias aisladas en hemocultivos de pacientes con Bacteremia, en un hospital universitario de Colombia. **Métodos.** Se desarrolló un estudio observacional, descriptivo y de corte transversal, en individuos mayores de 18 años, en donde se describió los hemocultivos positivos, aislados en todos los servicios del Hospital Universitario del Caribe. **Resultados.** De los 211 hemocultivos analizados, el 53,1% fueron hombres. Los microorganismos Gram positivos corresponden a 49,8%, con una alta frecuencia de *S. aureus* en un 16,1%. De los microorganismos Gram negativos fue aislado *E.coli* en un 18%. La resistencia a vancomicina se estableció en 4,4%. La *K. pneumoniae* presentó una resistencia a meropenem en un 15,3% de los casos. *E.coli*, *P. aeruginosa* y *E.cloacae* son sensibles a carbapénicos. Así en nuestro estudio las bacterias más frecuentemente aisladas en los hemocultivos fueron predominantemente Gram negativos, con resistencia a carbapénicos para algunas cepas de *K. Pneumoniae*.

1. Bacteriologa, Doctora en ciencias Básicas Biomédicas. Grupo de Investigación FARMABAC, Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

Cvlac: [https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod\\_rh=0000729841](https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000729841)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1104-6675>

2. Medico Magister en Farmacología. Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

Cvlac: [https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod\\_rh=0001384228](https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0001384228)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4245-0101>

3. Químico Farmacéutico, Magister en Farmacología. Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

Cvlac: [https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod\\_rh=0000978736](https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000978736)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7386-0074>

4. Médico. Grupo de Investigación FARMABAC, Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

Cvlac: [http://scienti.colciencias.gov.co:8081/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod\\_rh=0000051369](http://scienti.colciencias.gov.co:8081/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000051369)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1194-5504>

5. Medico. Grupo de Investigación FARMABAC, Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

Cvlac: [https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod\\_rh=0001611758](https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0001611758)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7273-4113>

6. Enfermera Msc farmacología. Grupo de Investigación FARMABAC, Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

Cvlac: [https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod\\_rh=0001611758](https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0001611758)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3816-6749>

Correo electrónico de correspondencia: [cristinabohorquezmoreno@gmail.com](mailto:cristinabohorquezmoreno@gmail.com) - [mduranl@unicartagena.edu.co](mailto:mduranl@unicartagena.edu.co)

**Palabras claves:** bacteriemia, farmacorresistencia microbiana, pruebas de sensibilidad microbiana, antibacterianos.

## Abstract

**Objective.** To describe the frequency of microorganisms and the antibiotic resistance of isolated bacteria in blood cultures of patients with bacteremia, in a university hospital in Colombia. **Methods.** An observational, descriptive, and cross-sectional study was developed in individuals older than 18 years, where the positive blood cultures were described, isolated in all the services of the University Hospital of the Caribbean. **Results.** Of the 211 blood cultures analyzed, 53.1% were men. The Gram-positive microorganisms correspond to 49.8%, with a high frequency of *S. aureus* in 16.1%. Of the Gram negative microorganisms, *E. coli* was isolated by 18%. Vancomycin resistance was established at 4.4%. *K. pneumoniae* showed resistance to meropenem in 15.3% of cases. *E. coli*, *P. aeruginosa* and *E. cloacae* are sensitive to carbapenems. Thus, in our study, the bacteria most frequently isolated in the blood cultures were predominantly Gram negative, with resistance to carbapenems for some strains of *K. pneumoniae*.

**Keywords:** bacteremia, drug resistance, microbial, drug microbial sensitivity tests, anti bacterial agents.

## Introducción

La resistencia bacteriana ha sido asociada a la ineficacia de los tratamientos farmacológicos establecidos para estos microorganismos, y repercutiendo de manera directa en un crecimiento proliferativo de infecciones con alta incidencia (1). En la actualidad la resistencia bacteriana es un problema global que afecta a muchas poblaciones y especialmente relacionadas con las instituciones de cuidado y atención de la salud de los pacientes. Las infecciones causadas por bacterias resistentes se asocian

a una mayor morbi-mortalidad y aumentos en los costos de los tratamientos (2,3); este problema se ha incrementado debido a prescripciones innecesarias o inadecuadas de antibióticos, debido a inoportunas pruebas diagnósticas, indicaciones en infecciones no requeridas o producto de la exposición microbiana a todos los antibióticos, ya sean por polimedicación (4,5). El Foro Económico Mundial (WEF) ha establecido que posiblemente el mayor riesgo para la salud humana se presenta en forma de bacterias resistentes a los antibióticos, de este modo, se han incluidos

estrategias para combatir la resistencia basándose en las prácticas tradicionales de control de infecciones, la administración de antibióticos y el desarrollo de nuevas terapias (6–8), para ello la Asamblea Mundial de la Salud aprobó en mayo de 2015 un plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. Este plan contiene 5 objetivos, los cuales son: mejorar la sensibilización y los conocimientos en materia de resistencia a los antimicrobianos, reforzar la vigilancia y la investigación, reducir la incidencia de las infecciones, optimizar el uso de medicamentos antimicrobianos y asegurar que se realicen inversiones sostenibles en la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos (7).

La resistencia a antibióticos varía geográfica y temporalmente en cuanto a su magnitud, este fenómeno es particular dependiendo directamente del tipo de antimicrobianos que adopte o implemente cada región, al igual que el tiempo que utiliza en cada protocolo de tratamiento realizado. Sin dejar de lado el perfil de resistencia adaptado en cada lugar (8).

Por esta razón es de gran importancia la implementación de sistemas de vigilancia y el desarrollo de líneas concretas para evaluar el impacto de las medidas de prevención y control de la resistencia a los antibióticos. Se estima que para 2050 las infecciones más comunes van a ser potencialmente mortales y las muertes anuales mundiales atribuibles a microorganismos resistentes

podrían alcanzar los 10 millones de casos (9,10). La OMS crea el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos que incluye actualmente a 52 países (25 de ingresos altos, 20 de ingresos medianos y siete de ingresos bajos). Asimismo, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades estiman de manera conservadora que al menos 23.000 personas mueren anualmente en los Estados Unidos como resultado de una infección con un organismo resistente a los antibióticos y que más de 2 millones están en un alto riesgo (11,12). Según un informe reciente del Reino Unido, el costo humano de la crisis de resistencia a los antibióticos se estima en 300 millones de muertes prematuras acumulativas para el año 2050, con una pérdida de hasta \$ 100 billones para la economía mundial (9).

Por lo tanto, se ha establecido amplios reportes que reconocen una alta resistencia en microorganismos relacionados con *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, seguidas de *Salmonella spp* (5,13–15). Igualmente, entre los datos más importantes se puede destacar la significativa resistencia de la *E. coli* a las cefalosporinas de tercera generación y a las fluoroquinolonas en regiones de África, América, mediterráneo oriental, Europa, Asia Sudoriental y Pacífico Occidental (16–18). Además, la resistencia a meticilina hasta un 80% de las infecciones por *S. aureus* en África y Pacífico Occidental, 90% en América y más del 50% en las otras regiones mencionadas

(19,20). La resistencia de *K. pneumoniae* a las cefalosporinas de tercera generación también es elevada y generalizada en todas estas regiones (21).

En Colombia se ha notado un aumento en la resistencia bacteriana, el sistema nacional de vigilancia reportó 2.362 casos de resistencia antimicrobiana por infección asociada a dispositivos durante 2016, de los cuales 21,3 % fallecieron. Por otro lado, en Cartagena no hay estudios que abarquen esta temática. Es por ello, que en el presente artículo se describe la frecuencia de microorganismos y la resistencia farmacológica de bacterias identificadas en hemocultivos de pacientes con bacteriemia en el Hospital Universitario del Caribe de Cartagena. El análisis continuo de la susceptibilidad a los antibióticos permite visualizar un panorama general de los perfiles de resistencia que presentan las bacterias, con la finalidad de predecir y establecer estrategias terapéuticas que orienten intervenciones farmacológicas más eficaces.

El empleo indiscriminado de los antimicrobianos que conduce a una rápida diseminación de cepas productoras de beta-lactamasas de espectro extendido, junto a la estadía hospitalaria prolongada de los pacientes, ha dado lugar a brotes importantes e incluso a la muerte del paciente. Un estudio realizado por Paterson y col reportó una tasa de mortalidad del 46% de los pacientes, de 216 pacientes con bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* BLEE positiva (22).

## Material y método

### Descripción de la población de estudio

Estudio observacional, descriptivo y de corte transversal, llevado a cabo entre enero y diciembre de 2015. Se describió el total de hemocultivos positivos realizados en pacientes mayores de 18 años, en el Hospital Universitario del Caribe en Cartagena, Colombia. Se excluyeron los cultivos realizados en otros líquidos corporales diferentes a sangre, y aquellos hemocultivos con reportes en el antibiograma incompletos. En relación con esta última consideración los antibiogramas incompletos no fueron tenidos en cuenta para la descripción de la susceptibilidad antibiótica pero sí para caracterizar la frecuencia de los microorganismos aislados.

Adicionalmente se recolectaron los datos de identificación del paciente, género, servicio de aislamiento, microorganismo aislado, sensibilidad, y resistencia, los cuales fueron llevados a una base de datos en Microsoft Excel.

### Identificación y pruebas de susceptibilidad

Se utilizaron métodos convencionales de identificación bioquímicas, conjunto con sistemas microbiológicos de detección empleando el panel MicroScan Pos Combo 34 (Beckman Coulter, USA), para bacterias

Gram Positivas y el panel Neg/Urine Combo 60 (Beckman Coulter, USA), para Gram negativas. La susceptibilidad a los antimicrobianos fue interpretada en términos cualitativos (sensible o resistente) para facilitar la orientación terapéutica. Para los diferentes microorganismos se utilizaron los antimicrobianos y las especificaciones técnicas sugeridos por el Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos (CLSI).

Para el registro de la información, el estudio descriptivo de las variables estudiadas y la determinación del número (N°) y porcentaje (%) de cepas resistentes a los antimicrobianos, se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS Statistics.

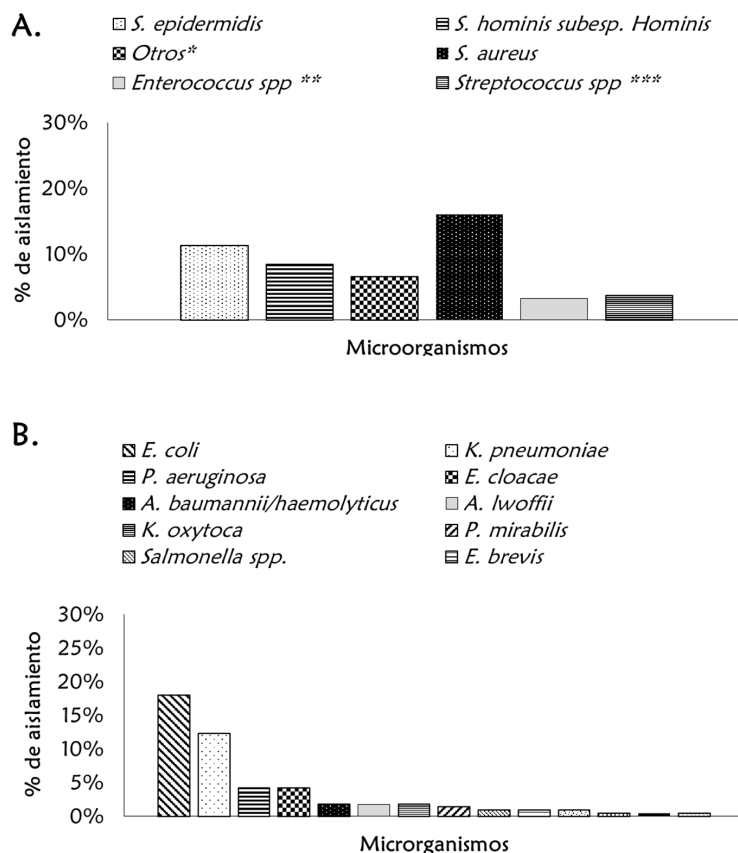
## Resultados

Durante el período de enero a diciembre de 2015 en el Hospital Universitario del Caribe fueron reportados 211 hemocultivos positivos. De éstos, se excluyeron 8 (3,79%), sólo para la descripción de los resultados de la resistencia a antimicrobianos, al no contar con la información completa del antibiograma, caso que ocurrió para el grupo de estreptococos. No se pudo obtener el total de hemocultivos realizados en este periodo de tiempo.

De los 211 reportes analizados, el 53,08 % fueron hombres. No se pudo analizar la variable edad, por no contar con dicha información. Se encontraron 22 especies bacterianas diferentes, de los cuales 36,36%

(n=8) correspondían a bacterias Gram positivas mientras que el 63,63% estaban distribuidas en bacterias Gram negativas. Los microorganismos Gram positivos corresponden a 49,8% (n= 105) de los hemocultivos positivos, siendo el más frecuente el *S. aureus* con un 16,1% (n=34). Agrupando los *Staphylococcus* *aureus* Negativa (SCN), éstos corresponden al 26,5% (n=56), distribuidos en 11 especies diferentes. De los microorganismos Gram negativos el más frecuentemente aislado fue *E.coli* en un 18% (n=38). En la tabla No 1, se describe la frecuencia de los microorganismos aislados en los hemocultivos (Figura 1).

**Figura 1.** Microorganismos aislados de hemocultivos. A. Bacterias Gram Positivas aisladas. B. Bacterias Gram Negativas aisladas.



Fuente: Elaboración propia.

La resistencia hallada para el *S. aureus* fue de 29,4% para Cefazolina y Oxacilina. En cuanto a la clindamicina, la resistencia encontrada en el grupo de estafilococo coagulasa negativa fue cercana al 50%, y sólo se halló un *S. aureus* que no era sensible.

La resistencia a vancomicina se documentó en 4,44% de los estafilococos, siendo sensibles todos los enterococos. Todos los gémenes Gram positivos fueron resistentes a la ampicilina y sensibles a la daptomicina.

**Tabla 1.** Frecuencia de resistencia de las principales bacterias Gram positivas aisladas en hemocultivos.

Agentes antimicrobianos	Microorganismos			
	Staphylococcus coagulasa negativa			
	<i>S. aureus</i> n=34 (%)	<i>S. epidermidis</i> n=24 (%)	<i>S. hominis subesp. Hominis</i> n=18 (%)	<i>Otros</i> n=14 (%)
Penicilina	33 (97)	24(100)	16(88,8)	14(100)
Ampicilina	34 (100)	24(100)	18(100)	14(100)



Agentes antimicrobianos	Microorganismos			
	Staphylococcus coagulasa negativa			
	<i>S. aureus</i> n=34 (%)	<i>S. epidermidis</i> n=24 (%)	<i>S. hominis subesp. Hominis</i> n=18 (%)	Otros n=14 (%)
Ampicilina/Sulbactam	10 (29,4)	15(62,5)	9(50)	13(92,8)
Cefazolina	10 (29,4)	15(62,5)	9(50)	13(92,8)
Ciprofloxacina	2 (5,8)	5(20,8)	1(5,5)	6(42,8)
Clindamicina	1 (2,9)	9(37,5)	7(38,8)	10(71,4)
Daptomicina	0	0	0	0
Eritromicina	3 (8,8)	12(50)	10(55,5)	8 (57,1)
Trimetoprim/Sulfa	1 (2,9)	6(25)	6(33,3)	3(21,4)
Vancomicina	0	0(0)	1(5,5)	2(14,2)
Gentamicina	0	0	0	6(42,8)
Oxacilina	10 (29,4)	15(62,5)	9(50)	13(92,8)
Rifampicina	0	0	0	1(7,1)
Tetraciclina	7 (20,5)	5(20,8)	3(16,6)	4(28,5)

Fuente: Elaboración propia.

El 86% de los gérmenes Gram negativos presenta resistencia a la ampicilina. De las principales bacterias Gram negativas, solo el 2,43% presentó resistencia a la amikacina mientras que el 23,17% fue resistente a la gentamicina. Se encontró cepas de

*K. pneumoniae* con resistencia a meropenem y doripenem, con una frecuencia de 15,3% y 11,5% respectivamente. *E.coli*, *P. aeruginosa* y *E.cloacae* fueron sensibles a carbapénicos (Ver tabla 2).

**Tabla 2.** Frecuencia de resistencia de las principales bacterias Gram negativas aisladas en hemocultivos.

Agentes antimicrobianos	Microorganismos			
	<i>E. coli</i> n=38 (%)	<i>K. pneumoniae</i> n=26 (%)	<i>P. aeruginosa</i> n=9 (%)	<i>E. cloacae</i> n=9 (%)
Ampicilina	31 (81,5)	26(100)	9 (100)	8(88,8)
Ampicilina Sulbactam	13 (34,2)	11(42,3)	0	5(55,5)
Piperacilina/Tazobactam	0	4(15,3)	2(22,2)	1(11,1)
Cefazolina	13 (34,2)	8(30,7)	0	9(100)
Cefepime	10 (26,3)	7(26,9)		1(11,1)
Cefotaxima	11 (28,9)	7(26,9)	3(33,3)	1(11,1)

Agentes antimicrobianos	Microorganismos			
	<i>E. coli</i> n=38 (%)	<i>K. pneumoniae</i> n=26 (%)	<i>P. aeruginosa</i> n=9 (%)	<i>E. cloacae</i> n=9 (%)
Ceftazidima	8 (21)	7(26,9)	0	1(11,1)
Cefoxitina	0	2(7,6)	0	7(77,7)
Ceftriaxona	11(28,9)	6(23)	4(44,4)	1(11,1)
Amikacina	0	2(7,6)	0	0
Gentamicina	10(26,3)	5(19,2)	4(44,4)	0
Tobramicina	9(23,6)	5(19,2)	2(22,2)	1(11,1)
Ciprofloxacina	15(39,4)	6(23)	0	2(22,2)
Ertapenem	1(2,6)	4(15,3)	0	0
Meropenem	0	4(15,3)	0	0
Doripenem	0	3(11,5)	0	0
Trimetoprim/Sulfa	26(68,4)	12(46,1)	0	1(11,1)
Aztreonam	10(26,3)	7(26,9)	0	1(11,1)
Tigeciclina	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia.

## Discusión

Durante años el desarrollo de metodologías para la detección de bacterias en sangre juega un papel fundamental en el diagnóstico del paciente con diferentes manifestaciones clínicas, especialmente relacionados con el desarrollo de cuadros febriles dado que permite establecer la presencia de posibles infecciones, y puede conllevar al correcto seguimiento de terapias clínicas dirigidas a la elección correcta de los antibióticos según el resultado del antibiograma respectivo (23). Por tanto, el hemocultivo es una herramienta de gran valor para el seguimiento adecuado y diagnóstico eficaz. A pesar de que existen otras metodologías más fidedig-

nas para la detección de bacterias aisladas, en la actualidad los hemocultivos son considerados herramientas de bajo costo que permiten realizar una indicación adecuada para la implementación de tratamientos cada vez direccionados (24,25).

El presente estudio demostró que los microorganismos más frecuentemente aislados en hemocultivos en el Hospital Universitario del Caribe, correspondieron a bacterias Gram negativas (50,23%), ligeramente superior sobre las Gram positivas, hallazgo que difiere del trabajo de Paz et al. (26,27), los cuales evidenciaron la presencia principalmente de organismos Gram positivos (67,6%). Asimismo, en el estudio se demostró que los microorganismos mayor-

mente aislados fueron SCN (26,5%), *E.coli* (18%) y *S. aureus* (16,1%), datos acordes al reporte de Paz et al. (27), quienes evidenciaron la detección de microorganismos Gram positivos y de igual modo demostrando variaciones en relación a la presencia de microorganismos Gram negativos, en donde el más frecuente fue *K. pneumoniae*, factor que puede estar relacionado con una amplia variación y diversidad en la microbiota de cada institución de salud (28,29). De igual manera, de acuerdo con los SCN, se aislaron 11 especies diferentes, siendo los más frecuentes el *S. epidermidis* en un 42%, similar a lo registrado por Fariña et al (30). En nuestro estudio el segundo más frecuente fue *S. hominis sub esp. hominis* con un 32,14%, difiriendo marcadamente con estos autores, en donde la segunda especie más frecuente fue *S. haemolyticus* (20,3%). Un comportamiento que fue dictaminado en las especies aisladas, indicando diferencias en la frecuencia de aparición. Estos contrastes epidemiológicos se podrían explicar debido a la diferencia geográfica y condiciones ambientales que podrían favorecer el desarrollo de algunas especies cuando se compararon ambos estudios (31).

Con respecto a los perfiles de resistencia de los antimicrobianos establecidos en nuestro estudio se ha indicado una alta ineficacia contra bacterias Gram positivas por parte de antibióticos de primera línea como penicilina, ampicilina, ampicilina/sulbactam y cefazolina (32,33). Y un comportamiento medianamente resistente puede observarse por parte de clindamicina, eritromicina y

oxacilina (33). De este modo, se ha establecido dentro de los perfiles de resistencia microbiana un comportamiento particular con respecto a oxacilina, donde *S. epidermidis* fue reportada en 62,5%, documentándose sensibilidad a vancomicina en todos los casos, hallazgos similares a lo encontrado por Fariña y cols, en donde además no se describió resistencia a vancomicina para ningún SCN, datos también encontrados por Paz et al. 26, sin embargo en nuestro estudio se hallaron 3 casos de resistencia a vancomicina (*S. hominis subesp. hominis*, *S. xylosum* y *S. saprophyticus*) (34). Por otro lado, se ha indicado que la resistencia por *S. aureus* a oxacilina en este estudio fue de 29,6% (35–37); sin embargo nuestro hallazgo fue muy similar a lo descrito por Sader en América Latina, y ligeramente superior a la cohorte en México (38).

Por otra parte, en los antibiogramas resultantes para bacterias Gram negativas se ha observado que una notable resistencia a ampicilina y medianamente a ampicilina/sulbactam conjunto a cefazolina y cefoxitina que resultó ser ineficaz contra las cepas de bacterias *E. cloacae* (39–41). De acuerdo a estos comportamientos evidenciados en bacterias Gram negativas, la resistencia encontrada en la mayoría de antimicrobianos para el *E.coli* es superior a lo descrito por Sader et al. (42). Lo que demuestra la pérdida progresiva de sensibilidad antimicrobiana a antibióticos de primera línea. La sensibilidad de *P. aeruginosa* a ceftazidime, cefepime y meropenem estuvo presente en todos los casos, a diferencia de lo reportado

por otros autores. Lo que indica que este microorganismo no representa un problema de resistencia; a diferencia de lo encontrado para *K. pneumoniae*, en donde se aislaron cepas resistentes a meropenem en un 15,3%, muy diferente a lo publicado por Sader en América Latina, en donde se reportó una sensibilidad del 99,8% a los carbapénicos (43,44). Lo que indica la necesidad de fortalecer campañas de promoción para el uso racional de antibióticos y medidas de contención para evitar la selección y diseminación de cepas con estos fenotipos de resistencia, evitando brotes de infecciones intrahospitalarias, que representen una grave amenaza para la vida de los pacientes.

La resistencia a los antibióticos se considera uno de los problemas primordiales de salud pública en el mundo, ya que constituye un desafío tanto en el plano de la epidemiología como del tratamiento farmacológico de las enfermedades infecciosas. Podemos concluir en nuestro estudio que las bacterias más frecuentemente aisladas en los hemocultivos fueron bacterias Gram negativas, con resistencia a carbapénicos para algunas cepas de *K. Pneumoniae*; además de la poca sensibilidad de los SCN a oxacilina, y resistencia de algunas de ellas a vancomicina.

El grupo epidemiológico de infecciones de la institución, debe realizar de forma rutinaria estudios para determinar los perfiles de resistencia y sensibilidad de los diferentes microorganismo aislados en las diferentes pruebas de laboratorio, implementando mecanismos de vigilancia que permitan

conocer de manera periódica y oportuna las tasas de resistencia antimicrobiana, ya que estas cambian en el tiempo, y con dicha información emplearla para el inicio de una adecuada terapia antimicrobiana empírica. Finalmente, se debe mejorar y procurar obtener la información de una forma más completa, para reducir así los sesgos y aportar un perfil epidemiológico más fidedigno.

## Referencias

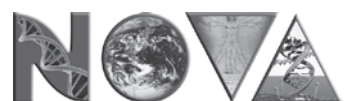
1. Lacoste J, Jarlier V, Coignard B, Vaux S. Estimating the morbidity and mortality associated with infections due to multidrug-resistant bacteria (MDRB ). Antimicrob Resist Infect Control [Internet]. 2016;5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13756-016-0154-z>
2. Woolhouse M, Waugh C, Perry MR, Nair H. Global disease burden due to antibiotic resistance – state of the evidence. J Glob Health. 2016;6:010306.
3. Kajumbula H, Fujita AW, Mbabazi O, Najjuka C, Izale C, Akampurira A, et al. Antimicrobial Drug Resistance in Blood Culture Isolates at a Tertiary Hospital, Uganda. Emerg Infect Dis. 2018;24:174–5.
4. Constanza L, Antolinez D, Bohorquez A, Corredor A. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. Nova.2015; 13(24): 55-82.
5. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. Perspect Medicin Chem. 2014;6:25–64.
6. Worthington RJ, Melander C. Combination Approaches to Combat Multi-Drug Resistant Bacteria. Trends Biotechnol. 2014;31:177–84.
7. WHO. Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services; 2016. p. 1–30.

8. Powers JH, Evans SR, Aaron S. Studying new antibiotics for multidrug resistant infections : are today ' s patients paying for unproved future benefits? *BMJ*. 2018;360:1–6.
9. González E, Zapata A, Sánchez-Henao D, Chávez-Vivas M. Resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y eritromicina en bacterias de la cavidad oral. *Nova*. 2020; 18(34): 27–45.
10. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015 : a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. 2019;19:56–66.
11. WHO. Worldwide country situation analysis : Worldwide country situation analysis : [Internet]. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2015. p. 1–43. Available from: [www.who.int/drugresistance/en/](http://www.who.int/drugresistance/en/)
12. WHO. Antimicrobial Resistance [Internet]. Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe; 2017. p. 1–7. Available from: [www.euro.who.int/sdgs](http://www.euro.who.int/sdgs) ©
13. Rasheed MU, Thajuddin N, Ahamed P, Teklemariam Z, Jamil K. ANTIMICROBIAL DRUG RESISTANCE IN STRAINS OF *Escherichia coli* ISOLATED FROM FOOD SOURCES. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2014;56:341–6.
14. Farrell DJ, Castanheira M, Mendes RE, Sader HS, Jones RN. In Vitro Activity of Ceftaroline Against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* : A Review of Published Studies and the AWARE Surveillance Program ( 2008 – 2010 ). 2012;55:206–14.
15. Reiss-mandel A, Regev-yochay G. *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* interaction and response to pneumococcal vaccination : Myth or reality ? 2016;351–7.
16. González C, Mendoza-medellín A. Resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación en enterobacterias productoras de infecciones nosocomiales y caracterización preliminar de los plásmidos involucrados. *Cienc ergo sum*. 2008;15:83–90.
17. Karczmarczyk M, Martins M, Quinn T, Leonard N. Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Food-Producing Animals. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77:7113–20.
18. Rath S, Sc M, Padhy RN, Ph D. Prevalence of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in an Indian teaching hospital and adjoining communities. *J Taibah Univ Med Sci [Internet]*. 2015;10:504–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtumed.2015.02.009>
19. Abdulgader SM, Shittu AO, Nicol MP, Kaba M. Molecular epidemiology of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Africa : a systematic review. *Front Microbiol*. 2015;6:348.
20. Lee AS, Lencastre H De, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Publ Gr [Internet]*. 2018;4:1–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
21. Lee S, Han SW, Kim KW, Song DY, Kwon KT. Third-generation cephalosporin resistance of community-onset *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in a secondary hospital. *Korean J Int Med*. 2014;29:49–56.
22. Paterson D, Mulazimoglu L, Casellas J. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum B-lactamase producing in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2000; 30: 473-478.
23. Elshout G, Monteny M, Wouden JC Van Der, Koes BW, Berger MY. Duration of fever and serious bacterial infections in children: a systematic review. *BMC Fam Pract [Internet]*. 2011;12:33. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2296/12/33>
24. Pien BC, Sundaram P, Raoof N, Costa SF, Mirrett S. The Clinical and Prognostic Importance of Positive Blood. *AJM [Internet]*. 2010;123:819–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amj-med.2010.03.021>

25. Snyder JW. Blood Cultures: the Importance of Meeting Pre-Analytical Requirements in Reducing Contamination, Optimizing Sensitivity of Detection, and Clinical Relevance. *Clin Microbiol News* [Internet]. 2015;37:53–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2015.03.001>
26. Maldonado NA, Múnera MI, López JA, Sierra P, Robledo C, Robledo J, et al. Tendencias de la resistencia a antibióticos en Medellín y en los municipios del área metropolitana entre 2007 y 2012 : resultados de seis años de vigilancia. *Biomédica*. 2014;34:433–46.
27. Paz-Montes, América Fuenmayor-Boscán A, Sandra-Toledo L, Piña-Reyes E, López-Dávila M, Navarro-López P. Incidencia de microorganismos en hemocultivos procesados en un hospital del estado Zulia y su resistencia a los agentes antimicrobianos Incidence of Microorganisms in Blood Cultures Processed at a Hospital in the State of Zulia and Resistance. *Kasmera*. 2015;43:16–33.
28. Navon-venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae* : a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41:252–75.
29. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:4.
30. Fariña N, Carpinelli L, Samudio M, Guillén R, Laspina F, Sanabria R, et al. *Staphylococcus coagulasa-negativa* clínicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Rev Chil infectología*. 2013;30:480–8.
31. Xu J, Yan C, Wang L, Zhou Q. Changes of Antimicrobial Resistance among Coagulase-Negative *Staphylococci* Isolated in 8 Consecutive Years in the First Bethune Hospital. *Phys Procedia* [Internet]. 2012;33:1190–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phpro.2012.05.195>
32. Duarte-Raya F, Granados-Ramírez MP. Resistencia antimicrobiana de bacterias en un hospital de tercer nivel. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2012;50:289–300.
33. Lazo-Arispe GF, Mamani -Flores E, Vargas-Loroño E, Camacho-Aguilar JR, Sahonero-Ampuero O. Sensibilidad y resistencia en el antibiograma del *Staphylococcus aureus* en pacientes del Hospital Clínico Viedma. *Rev Científica Cienc Médica*. 2013;16:15–7.
34. El-zawahry Y, Abdel-shafi S, Zaki M, El-serwy H. Phenotypic and Genotypic Investigation of Methicillin Resistant *Staphylococci* Species Isolated from Children with Sepsis in Egypt. *Egypt J Bot*. 2018;58:11–22.
35. Jeong J, Chang CL, Park TS, Lee SH, Kim SR, Jeong SH. Early Screening of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* from Blood Culture. *J Korean Med Sci*. 2002;17:168–72.
36. Bennett K, Sharp SE. Rapid Differentiation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* from Blood Cultures by Use of a Direct Cefoxitin Disk Diffusion Test. *J Clin Microbiol*. 2008;46:3836–8.
37. Walter J, Noll I, Feig M, Weiss B, Claus H, Werner G, et al. Decline in the proportion of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus* isolates from non-invasive samples and in outpatient settings , and changes in the co- resistance profiles : an analysis of data collected within the Antimicrobial Resistance. *BMC Infect Dis*. 2017;17:169.
38. Adame-g R, Toribio-jimenez J, Vences-velazquez A, Rodr E, Cristina M, Dionisio S, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Artisanal Cheeses in México. *Int J Microbiol*. 2018;2018:6.
39. Famiglietti A, Quinteros M, Vázquez M, Marín M, Nicola F, Radice M, et al. Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en Enterobacteriaceae. *Rev Argent Microbiol*. 2005;37:57–66.
40. Turnidge J. Cefazolin and Enterobacteriaceae: Rationale for Revised Susceptibility Testing Breakpoints. *Med Microbiol*. 2011;52:917–24.



41. Gutiérrez Lesmes O. Revista CUIDARTE. Rev Cuid. 2015;6:947–54.
42. Sader HS, Jones RN, Andrade-baiocchi S, Biedenbach DJ, Sentry T, Group P, et al. Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;44:273–80.
43. Velásquez J, Hernández R, Pamo O, Candiotti M, Pinedo Y, Sacsquispe R, et al. *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenemes . Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú. *Rev Soc Peru Med Interna.* 2013;26:192–6.
44. Echeverri-toro LM, Rueda Z V, Maya W, Agudelo Y, Ospina S. *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Chil infectología.* 2010;29:175–82.



**NOVA Publicación Científica  
en Ciencias Biomédicas**

# Uso de tecnologías de información y comunicación en el screening de la depresión asociada al consumo de sustancias psicoactivas

Use of information and communication technologies in screening of depression associated with the use of psychoactive substances

Edith Villalobos Bolívar<sup>1</sup>, Luis Gilberto Agreda López<sup>2</sup>, Ángel Alberto Varón Quimbayo<sup>3</sup>

## Resumen

**Introducción.** El consumo de sustancias psicoactivas (SPA) se consideran como una enfermedad crónica debido a que el inicio, curso, dirección, y resultado es impredecible en algunos casos y adicionalmente son trastornos multicausales como es el caso de la depresión; según datos reportados por el Centro de Adicciones de Barcelona “la incidencia de depresión en pacientes con abuso de sustancias oscila entre el 6% y 70% en los consumidores de SPA”. Con este panorama se debe comprender que la intervención debe desarrollar la promoción de la salud y la prevención de la enfermedad, con la aparición de la biotecnología con el uso y aplicación de las tecnologías de la información y las comunicaciones (TIC) en las ciencias de salud y la vida para el diagnóstico, prevención, supervisión, tratamiento. **Objetivo.** Desarrollar un software que permita generar una alerta para la identificación temprana de la depresión asociada al consumo de sustancias psicoactivas en adultos, mediante el uso de una TICs previamente validada, durante el año 2019. **Metodología.** Investigación Tecnológica, utilizando la metodología “UWE” con enfoque al desarrollo de software para el dominio web. **Resultados.** En esta propuesta de investigación se avanzará en el desarrollo del prototipo del producto para la identificación temprana de la depresión con el fin de mejorar el proceso de toma de decisiones clínicas, en el momento mismo de la atención,

---

1. MsC Salud Pública y Desarrollo Social. Docente Fundación Universitaria del Área Andina. Programa Enfermería.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5993-5404>  
CvLac: [https://scienti.colciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod\\_rh=0001599196](https://scienti.colciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0001599196)  
Google Scholar: <https://scholar.google.es/citations?hl=es&pli=1&user=mlHdHAcAAAAJ>

2. MsC Salud Pública y Desarrollo Social. Docente Fundación Universitaria del Área Andina. Programa Enfermería. Coordinador Semillero  
Conexión Salud – Grupo de Investigación Guanaco.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8648-8267>  
CvLac: [https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod\\_rh=0001466332](https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0001466332)  
Google Scholar: <https://scholar.google.es/citations?pli=1&user=OPToMXgAAAAJ>

3. Mag Gestión Diseño y Dirección de Proyectos. Docente Fundación Universitaria del Área Andina. Programa Ing de Sistemas  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0643-358X>  
CvLac: [https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod\\_rh=0000012309](https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000012309)  
Google Scholar: <https://scholar.google.es/citations?user=52pp2VQAAAAJ&hl=es>

Correo electrónico de correspondencia: [glvillalobos@areandina.edu.co](mailto:glvillalobos@areandina.edu.co) - [lagreda@areandina.edu.co](mailto:lagreda@areandina.edu.co) - [avaron2@areandina.edu.co](mailto:avaron2@areandina.edu.co)

con base en la información registrada en el software llamado MEASDEP (Medición de la depresión en consumidores de SPA).

**Palabras claves:** sustancias psicoactivas (SPA), depresión, consumo, biotecnología, tecnología de la información y la comunicación (TIC).

## Abstract

**Introduction.** The consumption of psychoactive substances (SPA) is considered a chronic disease because the onset, course, direction, and result is unpredictable in some cases and additionally they are multi-causal disorders such as depression; according to data reported by the Barcelona Addiction Center “the incidence of depression in patients with substance abuse ranges between 6% and 70% in SPA users”. With this outlook, it should be understood that the intervention should develop the promotion of health and the prevention of disease, with the appearance of biotechnology with the use and application of information and communication technologies (ICT) in science, health and life for diagnosis, prevention, supervision, treatment. **Objective.** To develop a software that allows generating an alert for the early identification of depression associated with the use of psychoactive substances in adults, through the use of a previously validated ICT, during 2019. **Methodology.** Technological Research, using the “UWE ”With a focus on software development for the web domain. **Results.** In this research proposal, progress will be made in the development of the product prototype for the early identification of depression in order to improve the clinical decision-making process, at the moment of care, based on the registered information in the software called MEASDEP (Measurement of depression in SPA consumers)

**Keywords:** psychoactive substances (SPA), depression, consumption, information and communication technology (ICT), medical informatics.

## Introducción

El consumo de sustancias psicoactivas en adultos jóvenes es un problema de salud pública que ha tenido un crecimiento marcado en los últimos años. Según el Informe Mundial de Drogas 2018 de UNODC, un cuarto de billón de personas o cerca del 5% de la población adulta, entre los 15 y los

64 años, consumió drogas por lo menos en una ocasión; es de aclarar que a partir del 2015 (1) se considera droga toda sustancia química que entre en contacto con los diferentes sistemas del cuerpo humano produciendo efectos a corto y largo plazo que se traducen clínicamente en la presencia de un síndrome de abstinencia si no se utiliza la droga y de tolerancia progresiva a su uso

generando un impacto negativo en el desarrollo humano, la salud y la calidad de vida de los consumidores.

En cuanto a los efectos negativos, que en su mayoría se asocian al post consumo, el consumidor puede experimentar diversos efectos adversos acorde como la sustancia interaccione con el cuerpo humano y sus diferentes sistemas provocando alteraciones que pueden ser fatales. La depresión asociada al consumo de sustancias psicoactivas es uno de los efectos más comunes en la población consumidora de Sustancias Psicoactivas (SPA) (2), la morbilidad de los trastornos psiquiátricos en general y de los trastornos afectivos o depresivos asociados al consumo de drogas y alcohol se ha multiplicado en los últimos 10 años (3). Uno de los trastornos más comunes que afectan la salud mental es la ansiedad y los trastornos de ansiedad tienen relación directa con los problemas de violencia, la pobreza y el consumo de sustancias psicoactivas como estresantes de la sociedad en que vivimos (4). Los síntomas psiquiátricos negativos se conciben como una dimensión característica de diferentes trastornos e incluyen la afectividad negativa y el déficit cognitivo.

En la actualidad los trastornos por consumo de SPA se consideran como una enfermedad crónica debido a que el inicio, curso, dirección, y resultado son impredecibles en algunos casos. Según datos reportados por el Ministerio de Salud, uno de los factores causales del riesgo de depresión en pacientes, está asociado al abuso y la dependencia de las sustancias psicoactivas incluidos los

consumidores de alcohol y cigarrillo(5); con este panorama se debe comprender que la intervención debe ser integral e integra donde la aparición de las tecnologías de la información y las comunicaciones (TIC) en salud son vitales para el diagnóstico, prevención, supervisión, tratamiento o alivio de una enfermedad; como lo menciona el Decreto 4725 de 2005.

En este sentido las Tecnologías de la Información y la Comunicación, también conocidas como (TIC), son el conjunto de tecnologías desarrolladas para gestionar información y enviarla de un lugar a otro y abarcan un abanico de soluciones amplio, las cuales han evolucionado para acceder y compartir información en la Web como también han permitido el desarrollo de sistemas adecuados para ubicarlos en línea y fuera de línea para la investigación colaborativa, asincrónica y de discusión para aumentar la generación y transferencia de conocimientos(6). Las TIC incluyen las tecnologías para almacenar información y recuperarla después, enviar y recibir información de un sitio a otro, o procesar información para poder calcular resultados y elaborar informes (7).

Por tanto, esta investigación se enfoca en identificar las herramientas, las técnicas, la metodología y los IDE (entornos de desarrollo integrados), adecuados para desarrollar un producto de software orientado a la web para la medición de la depresión y que genere alertas tempranas en la población de adultos consumidores de SPA inicialmente en la ciudad de Bogotá,

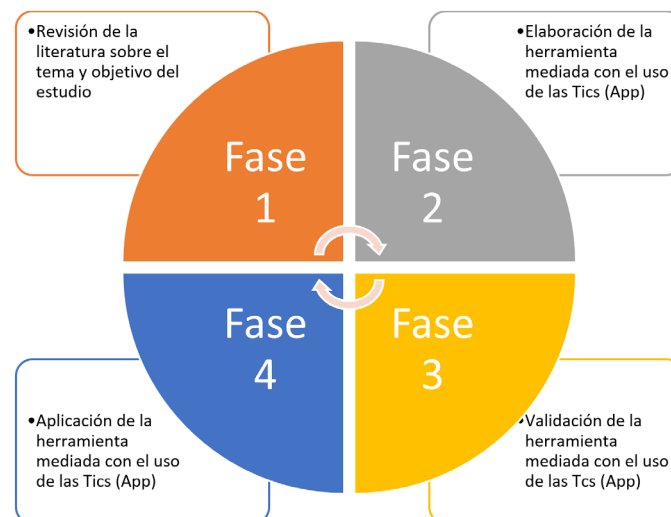
## Material es y metodos

**Metodología:** Investigación Tecnológica. UWE (UML-BASED WEB ENGINEERING)

“UWE” es una metodología apoyada en el desarrollo de software con enfoque de la ingeniería del software para el dominio web, la cual utiliza un lenguaje de modelado específico del dominio basado en UML Lenguaje unificado para modelamiento de sistemas de información (software), los Modelos de UWE son una extensión de UML que presenta los siguientes modelos:

- Modelo de requerimientos donde se hace la especificación de requerimientos del software y se generan los modelos de casos de uso donde se ilustra la funcionalidad del producto,
- El Modelo de contenido es un modelo normal donde se grafican las clases donde expresa el dominio o la arquitectura de cada atributo en su respectiva clase
- El modelo de navegación o navegabilidad se realiza para representar en modo grafico cada uno de los nodos con su respectivo link para facilitar el entendimiento de la forma en que se podrá navegar por el software, para hacerlo más amigable y con esto apuntarle al criterio de usabilidad.
- El Modelo de presentación se realiza con el objetivo de representar los elementos que serán utilizados en cada uno de los índices del software (botones, textos, formularios, imágenes, entradas de texto entre otras).
- El Modelo de procesos representa de forma gráfica las relaciones existentes entre las diferentes clases, para ilustrar la funcionalidad dentro del producto (8).

**Figura 1.** Fases del proceso investigativo.



**Fuente:** Elaboración propia.



**FASE 1:** Revisión de la literatura para implementar la metodología UWE para el desarrollo del software Measdep para la identificación temprana de la depresión en adultos consumidores de SPA.

**FASE 2:** Diseño y desarrollo del software Measdep para la identificación de la depresión en adultos consumidores de SPA.

**FASE 3:** Testing pruebas del software Measdep para validar la funcionalidad del software según los requerimientos establecidos

**FASE 4:** Implementación del software Measdep para la identificación de la depresión en adultos consumidores de SPA

La metodología UWE es una extensión del lenguaje unificado para modelo de sistemas de información UML y se enfoca única y exclusivamente a desarrollos orientados a la web, para realizar unos muy buenos diseños se recomienda utilizar la herramienta CASE (Diseño asistido por computadora) Magic UWE que fue desarrollada para facilitar el trabajo al profesional de diseño (9).

Para el desarrollo de software seleccionamos el entorno de desarrollo XAMP que es una plataforma gratuita distribuida por apache que es un servidor local y que dentro de sus herramientas cuenta con el lenguaje PHP y un sistema gestor de bases de datos Mysql para el desarrollo de la base de datos, también se utiliza CSS la hoja

de estilo en cascada para mejorar la presentación del producto como tal, para la visualización en los diferentes tipos de dispositivo móvil se utiliza una técnica Responsive que consiste en la adaptación de contenidos web a dispositivos móviles para facilitar su usabilidad.

## Resultados

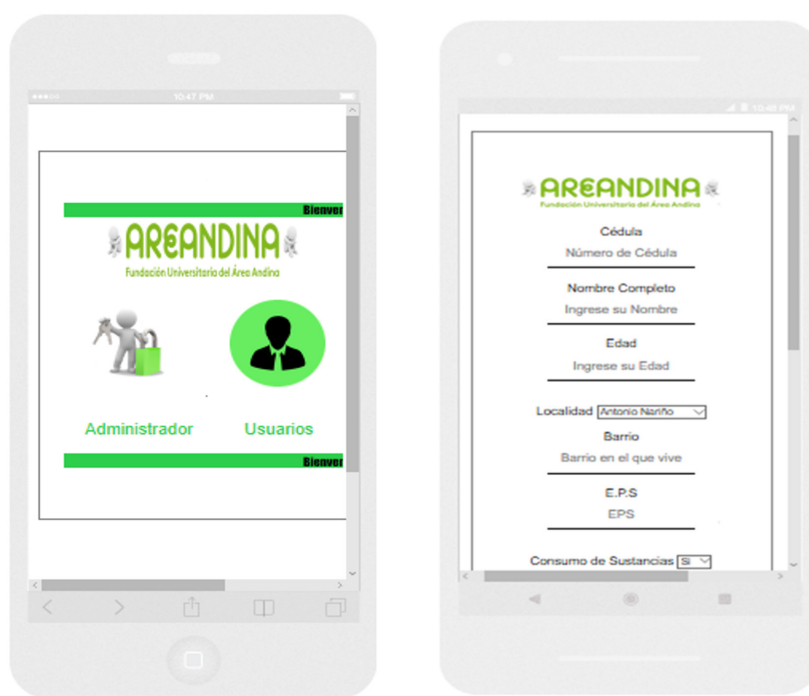
En búsqueda de automatizar procesos de tamizaje para la depresión en consumidores de sustancias psicoactivas, se desarrolla un software para la medición y la evaluación de los consumidores de spa. Para el desarrollo de dicho instrumento se trabaja de manera conjunta el área del programa de enfermería y del programa de ingeniería de sistemas de la Fundación Universitaria del Área Andina apoyándose en la implementación de la Ingeniería web, adaptando la metodología UWE; durante el proceso investigativo se plasman las bases y referentes teóricos para definir las características del diseño de la aplicación el cual será utilizado por el área de ingeniería de sistemas la Fundación Universitaria del Área Andina que elabora la especificación de requisitos de software.

MEASDEP es el nombre que recibe el software donde se reconocerá y creará usuarios para la captación de información personal con el objetivo de brindar apoyo que permita la identificación temprana de la depresión asociada al consumo

de SPA; adicionalmente permite gestionar el instrumento de tamizaje seleccionado, el cual cuenta con un cuestionario de 10 preguntas donde cada una de ellas se identifica con un número original y tiene su respectivo enunciado los cuales una vez diligenciadas permite generar resultados y puntuaciones para posteriores recomendaciones pertinentes referenciadas por la Guía de Práctica Clínica

El software MEASDEP como instrumento, brindara soporte a enfermeros profesionales de la Fundación universitaria del Área Andina para detectar la depresión temprana en adultos y adolescentes, consumidores de sustancias psicoactivas SPA.

**Figura 2.** Pantalla de inicio de la aplicación.



**Fuente:** Elaboración propia.

## Discusión

Los avances tecnológicos fácilmente pueden ser vistos como una revolución que representa la creación de oportunidades y desafíos sin precedentes en el área de las ciencias de la salud; de igual forma el uso de las TIC

es clave para agilizar procesos y procedimientos, también; elimina barreras y permite reducir las desigualdades y superar la pobreza, asegurando un cuidado integral a una población.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la ciber salud (conocida tam-

bién como eSalud o e-health) consiste “en el apoyo que la utilización de las tecnologías de la información y las comunicaciones TIC, brinda a la salud y a los ámbitos relacionados con ella, con inclusión de los servicios de atención de salud, la vigilancia y la documentación sanitarias, así como la educación, los conocimientos y las investigaciones en materia de salud”.

Mediante el uso de estas tecnologías se busca abordar la prevención, el diagnóstico, el tratamiento y el monitoreo o incluso la administración de los sistemas sanitarios. En la actualidad contamos con diversas aplicaciones como: -“Social Diabetes” lo cual es una herramienta de ayuda al control de la diabetes tipo 1 y 2, permite a los pacientes calcular las dosis de hidratos y la administración de insulina; -“Universal Doctor” la cual es conocida en algunos países como Universal Doctor Speaker tratándose de una aplicación que busca servir como traductor médico que facilita las consultas tanto a profesionales de la salud como a pacientes; -“Foto Skin” cuya aplicación es el resultado de investigación desarrollada por la Universidad de Alcalá de Henares, en Madrid, España, la cual sirve de guía para pacientes y médicos para el diagnóstico del cáncer de piel y consiste en un portal web, con un tutorial, donde se aprende a tomar las imágenes para formar un registro e indicar el fototipo de piel del usuario lo cual ya puede ayudar en cuanto a la prevención de la enfermedad”. Todas estas aplicaciones permiten al personal de salud y a los pacientes un acceso a la salud solo con el uso de su dispositivo móvil.

Si bien existe variedad de aplicaciones, aún no se cuenta con un software adaptable a dispositivos móviles que permita la detección de la depresión asociada al consumo de SPA, por lo tanto, se debe reconocer la innovación que esta investigación ofrece. MEASDEP como software permitirá al usuario el registro voluntario para captar información personal con el objetivo de generar una alerta temprana de los estados depresivos asociados al consumo de SPA. La herramienta cuenta con un cuestionario de 10 preguntas que permitirán identificar usuarios con depresión acorde a resultados y puntuaciones, brindando soporte para posteriores tomas de decisiones referenciadas por la Guía de Práctica Clínica (5).

## Conclusiones

La revisión bibliográfica dentro del contexto de instrumentos utilizados para realizar el tamizaje para detectar depresión determina que dentro de los instrumentos que se utilizan en el marco comunitario la mejor opción es el CES-D debido a que es auto administrado y permite medir la depresión en 4 ocasiones y así poder determinar un riesgo de depresión. Se ha diseñado y desarrollado el software con orientación a la web MEASDEP, y mediada por el uso de las Tics usando la escala CES-D, la cual permitirá identificar a la población con riesgo a la depresión o con depresión asociada al consumo de sustancias psicoactivas siendo esta capaz de recolectar información e interactuar con el usuario consumidor de spa.

Se espera que en el segundo semestre de 2019 se lleve a cabo la implementación del software Measdep, herramienta mediada por el uso de las Tics la cual cuenta con la documentación específica de la ingeniería del software Web, según la metodología UWE: (Documento de E.R.S, los diagramas casos de uso, el modelo de contenido, el modelo de navegabilidad, el modelo de presentación y el modelo de Procesos), más el software desarrollado, e implementado con el objeto de iniciar el tamizaje en la población de localidad de Chapinero en adultos jóvenes consumidores de sustancias psicoactivas

## Referencias

1. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC). Informe Mundial sobre las Drogas. [Internet].; 2018. Disponible en: [https://www.unodc.org/wdr2018/prelaunch/WDR18\\_Ex-Sum\\_Spanish.pdf](https://www.unodc.org/wdr2018/prelaunch/WDR18_Ex-Sum_Spanish.pdf)
2. Gainza I, Nogué S, Martínez Velasco C, Hoffman RS, Burillo-Putze G, Dueñas A, et al. Intoxicación por drogas. Anales Sis San Navarra vol.26. [Internet]. 2003. Disponible en: <https://recyt.fecyt.es/index.php/ASSN/article/view/5014/4252>
3. Bohnert S, Miech A. Changes in the Association of Drug Use with Depressive Disorders in Recent Decades: The Case of Cocaine. Substance Use & Misuse. 2010;; p. Vol. 45 Issue 10, p1452-1462. . [Internet]. 2010. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4109050/>
4. Posada-Villa J, Rodríguez M, Duque P, Garzón A. Prevalencia y factores de riesgo de comportamientos relacionados con suicidio en el Estudio Nacional de Salud Mental, Colombia 2003 (ENSM). NOVA [Internet]. 30jun.2007 [citado 28sep.2020];5(7). Available from: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/87>Bohnert S, Miech A. Changes in the Association
5. Posada-Villa J, Buitrago-Bonilla J, Medina-Barreto Y, Rodríguez-Ospina M. Trastornos de ansiedad según distribución por edad, género, variaciones por regiones, edad de aparición, uso de servicios, estado civil y funcionamiento/discapacidad según el Estudio Nacional de Salud Mental-Colombia. NOVA [Internet]. 31dic.2006 [citado 5oct.2020];4(6). Available from: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/67>
6. Ministerio de Salud y Protección Social y Colciencias (2013) Guía de Práctica Clínica Depresión, volumen 22.[Consultado el 23 de enero de 2018]. Disponible en: [http://gpc.minsalud.gov.co/gpc\\_sites/Repositorio/Conv\\_500/GPC\\_td/GPC\\_td\\_completa.aspx](http://gpc.minsalud.gov.co/gpc_sites/Repositorio/Conv_500/GPC_td/GPC_td_completa.aspx)
7. Millan J, Yunda L. An Open-Access Web-based Medical Image Atlas for Collaborative Medical Image Sharing, Processing, Web Semantic Searching and Analysis with Uses in Medical Training, Research and Second Opinion of Cases. NOVA [Internet]. 31dic.2014 [citado 28sep.2020];12(22). Available from: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/273>
8. Universidad de Antioquia. Aprende en Línea Plataforma Académica para Investigación. [Internet].; 2015. Disponible en: <http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/investigacion/mod/page/view.php?id=3118>
9. Institute for Informatics. Universitat München UWE – UML-based Web Engineering (18 de 06 de 2016). [Internet]. Disponible en: <http://uwe.pst.ifi.lmu.de/toolUWE4JSF.html>

# Evaluación de la calidad del agua de la vereda Río Suárez de Puente Nacional, Santander

Water quality evaluation of the rural area of Río Suárez of Puente Nacional, Santander

Lucía Constanza Corrales Ramírez<sup>1</sup>, Yurley Natalia Santamaria Mosquera<sup>2</sup>,  
Dario Alberto Luccioli Peña<sup>3</sup>, Miguel Angel Castañeda Casas<sup>4</sup>

## Resumen

**Objetivo.** Determinar la calidad del agua que abastece a la población de la Vereda Río Suárez del municipio de Puente Nacional por medio del cálculo del índice de riesgo de la calidad del agua (IRCA). **Métodos.** Se tomaron 10 muestras de diferentes puntos de la red de distribución del agua veredal, se realizó análisis físico-químico y microbiológico por técnica de filtración por membrana bajo parámetros del Instituto Nacional de Salud. **Resultados.** El análisis físico-químico mostró cuantificación de hierro elevado y nivel de turbiedad inadecuado lo que puede afectar el sabor y el aspecto del agua. El recuento de coliformes totales fue >300 UFC/100ml., con identificación de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus* entre otras, habitantes de suelo y aguas que pueden ser causantes de infecciones gastrointestinales e infecciones urinarias, resultados que indican que el agua no es apta para consumo humano.

**Palabras claves:** calidad del agua, análisis microbiológico, análisis físico-químico, coliformes totales, coliformes fecales.

---

1. Docente Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico.  
Número de certificación CvLac: 000048264120121119123  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2398-348X>

2. Hospital Regional de Vélez - Santander.  
Número de certificación CvLac es: 00017431912019918188  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0740-4142>

3. Hospital Central de la Policía.  
Número de certificación CvLac: 000174319620199181832  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1716-2327>

4. Laboratorio COLCAN.  
Número de certificación CvLac: 000174317920199181750  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2985-3114>

Correo electrónico de correspondencia: lcorrales@unicolmayor.edu.co

## Abstract

**Objective.** To determine the quality of the water that supplies the population of the Vereda Rio Suarez of the municipality of Puente Nacional through the calculation of the risk index of water quality (IRCA). **Methods.** 10 samples were taken from different points of the water distribution network, physical-chemical and microbiological analysis was performed by membrane filtration technique under parameters of the National Institute of Health. **Results.** The physical-chemical analysis showed high iron quantification and inadequate turbidity level that can affect the taste and appearance of the water. The total coliform count > 300 CFU / 100ml., with identification of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus* among others that inhabit soils and waters and can cause gastrointestinal infections and urinary infections and is not suitable for human consumption.

**Keywords:** water quality, microbiological analysis, physical-chemical analysis, total coliforms, fecal coliforms

## Introducción

Colombia es uno de los países con mayor número de recursos hídricos en el mundo, cuenta con varios tipos de agua: lluvia, superficial, subterránea, marina, oceánica y agua de alimentación glacial; es un recurso básico y un bien de uso público, no obstante en el proceso de desarrollo económico, se incrementan las actividades que requieren el uso intensivo del agua, por lo cual las problemáticas ambientales asociadas a este recurso también aumentan. Dentro del agua superficial se encuentran los ríos de agua dulce que fluyen en la zona continental, de las partes altas hacia las bajas; desde los pequeños arroyos que carecen de nombre, hasta los grandes ríos como el Amazonas (1).

El río Suárez es una fuente de agua muy importante en los departamentos de Boyacá y Santander, nace en la Laguna de Fúquene, finalmente desemboca en el río Sogamoso. En las últimas décadas se han descrito casos relacionados con contaminación que afecta este recurso (2).

Esta descrito que el uso de agua no apta lleva a la aparición de enfermedades generadas por la ingesta de microorganismos patógenos. La contaminación se puede dar de diferentes formas: consumo directo del líquido, consumo de alimentos regados con ésta, contacto con fómites o excretas de humanos y animales y contaminación química, y en cualquier caso generan consecuencias para la salud en el humano (3).



El agua apta para consumo ha sido definida en las Guías de Calidad del Agua de Bebida de la Organización Mundial de la Salud – OMS, como “adecuada para consumo humano y para todo uso doméstico habitual, incluida la higiene personal”. (4) Para ello es importante que el agua que consumen en las viviendas cuente con las características apropiadas definidas en el decreto 2115 de 2007. La mayor parte de las enfermedades prevalentes en los países en desarrollo, donde el abastecimiento de agua y el saneamiento son deficientes, son causadas por bacterias, amebas, virus y helmintos (5).

En el mundo se reportan numerosos casos de enfermedades relacionadas con la calidad del agua, como consecuencia de deficiencias en el tratamiento del agua o por la pérdida de la integridad de la red de distribución de agua (6).

En Génova en el año 1993, la Unión Europea elaboró la Directiva 98/83/EC acerca de la calidad del agua para el consumo humano, adoptada por el Consejo el 3 de noviembre de 1998. Esta fue elaborada mediante la revisión de los valores de los parámetros de la antigua Directiva del Agua Potable de 1980, haciéndolos más estrictos de acuerdo con los últimos conocimientos científicos disponibles y la información ofrecida por las directrices de la OMS y del Comité Científico de Toxicología y Ecotoxicología (4).

Esta nueva Directiva proporcionó una base

sólida tanto para los consumidores en la Unión Europea como para los proveedores de agua potable, permitiendo el establecimiento de los estándares europeos de la calidad del agua potable, los cuales son referencia internacional para el establecimiento de estándares y seguridad del agua potable (7). En EEUU la agencia de Protección Ambiental-EPA (Environmental Protection Agency) creó una ley de agua limpia (CWA, por sus siglas en inglés) que es fundamental en la protección de la calidad de las aguas superficiales en los Estados Unidos (8). En Colombia la resolución 2115 del 2007 es la que indica las condiciones aceptables de calidad del agua potable. Además de contar con un manual para la toma de muestra de agua potable estandarizado por el Instituto Nacional de Salud.

Existe gran variedad de agentes patógenos como bacterias, hongos y virus. Las bacterias patógenas oportunistas se pueden encontrar como parte de la flora de los sistemas acuáticos, estas bacterias por lo general producen enfermedades en individuos susceptibles o inmunosuprimidos, algunas de éstas son: *Aeromonas spp*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* y *Mycobacterium*.

Colombia es uno de los países con mayor número de recursos hídricos en el mundo, riqueza hídrica que se ve representada por sus extensas redes de aguas atribuidas a su ubicación geográfica y relieve, condiciones que son favorables para la existencia de un importante número de cuerpos

de agua lentícos (aguas estancadas como lagos y pantanos) y enormes extensiones de humedales (9) entre estas redes de agua se encuentra el río Suárez.

El río Suárez, nace en la Laguna de Fúquene en los límites de los departamentos de Cundinamarca y Boyacá, a una altura de 3000 m.s.n.m., su cuenca posee una extensión de 9823 Km<sup>2</sup>, de los cuales a Santander le corresponde el 35.25%. Su caudal medio multianual es de 195 m<sup>3</sup> /seg. (10). El Área de Desarrollo Rural de la Hoya del Río Suárez la conforman 13 municipios, 5 en Boyacá, Chitaraque, Monquirá, San José de Pare, Santana y Toguí y 8 municipios en Santander, Barbosa, Chipatá, Guavatá, Güepsa, Puente Nacional, San Benito, Suaitá y Vélez (11).

Desde hace décadas el río ha estado sometido a focos de contaminación, de los cuales existen reportes que involucran no solo al río, sino a los acueductos que se abastecen del mismo. En 1996 el periódico el Tiempo, publicó el artículo “RÍO SUÁREZ FOCO DE INFECCIÓN”, donde refieren el vertimiento de las aguas negras del río Chiquinquirá al río Suárez, convirtiéndolo en una verdadera alcantarilla, problema que se venía presentando desde varios años atrás. Los más perjudicados con esta situación eran los habitantes ubicados a lo largo de la ribera, en un tramo superior a los 20 kilómetros, comprendido desde el sitio La Balsa en jurisdicción de Chiquinquirá, cruzando por el municipio de Saboyá, hasta llegar al corregimiento de Garavito, en

límites con el departamento de Santander (12). Posteriormente en 1997 en un estudio realizado por la Universidad Nacional, se afirma que no es apto ni siquiera para actividades recreativas; a pesar de ello, en época de sequía, los habitantes de Güepsa o Barbosa (Santander), el mayor núcleo urbano de la Hoya, se surten de sus aguas (13).

Estas aguas no son aptas para consumo humano por la presencia de coliformes fecales. Además, el agua no es apta para riego, debido a que puede generar problemas sanitarios a la comunidad que consuma frutas con cáscara, hojas y tallos de hortalizas sin cocinar. Si se utiliza las aguas del río como destino final de los desechos, se debe determinar la carga crítica, es decir, la medida en que éste estaría en condiciones de resistir la entrada de contaminantes específicos sin que a largo plazo se produzcan cambios en los comportamientos o procesos de dicho ecosistema. Esta problemática del recurso agua al igual que la del suelo genera muchos conflictos para su uso (14).

En el año 2012 la Alcaldía de Puente Nacional puso en alerta a su comunidad sobre el envenenamiento de las aguas del río en una entrevista para el canal Caracol, en la cual el Alcalde electo en ese año, el señor José David Beltrán informó “el día miércoles 22 de febrero, en las horas de la tarde se detectó una contaminación en donde se presentaron en la superficie del río unos peces muertos y en estado de descomposición los cuales han sido tomados y enviados

a la secretaria del departamento. En la Secretaría de Salud, allá se están haciendo los diferentes análisis y probablemente se demoren unos 15 días” (15).

Más tarde en el año 2014, se da una nueva alerta en varios municipios por contaminación del río Suárez, un volcamiento en el corregimiento de Garavito en el departamento de Boyacá de un tracto camión que transportaba petróleo alertó a los municipios que se abastecían del agua del río Suárez, haciendo un llamado en ese entonces a las poblaciones sobre evitar el consumo de estas aguas (16).

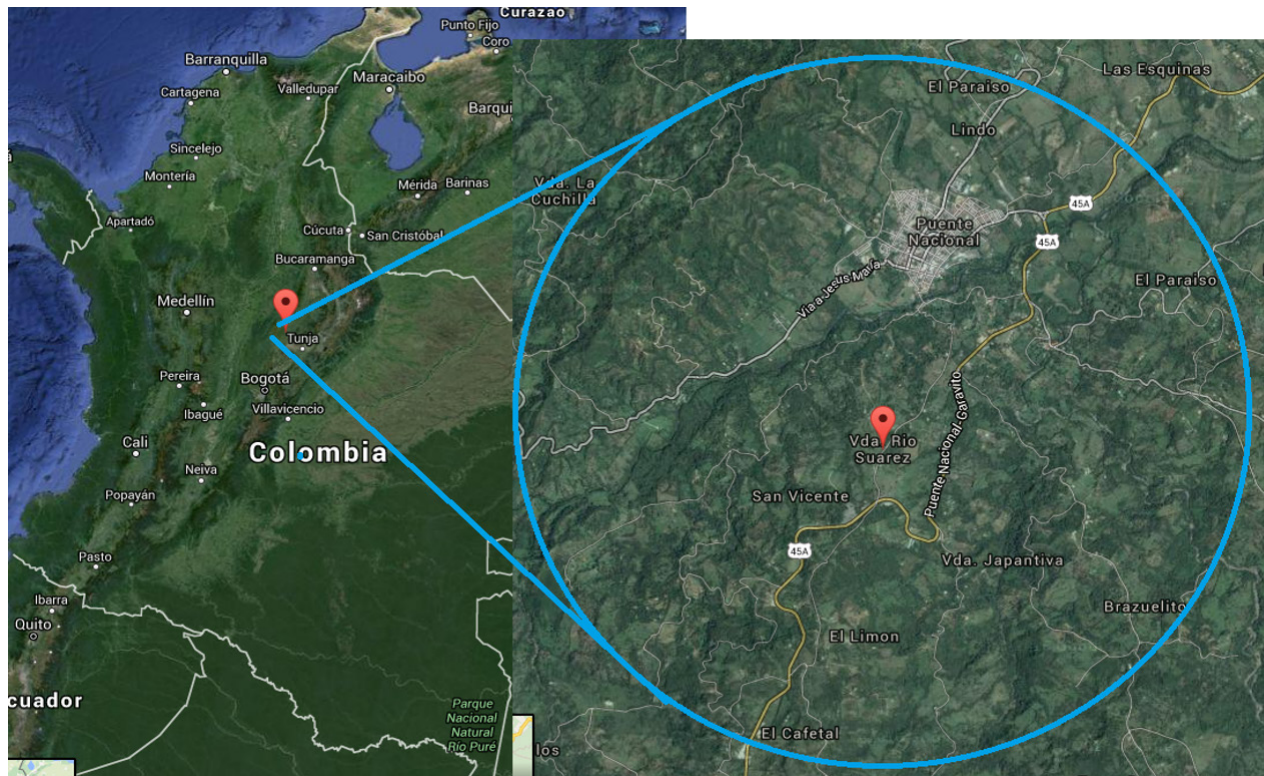
Según el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM) indica que hasta el día de hoy no se han realizado estudios acerca de la calidad del agua para consumo humano que llega a las viviendas en la vereda Río Suárez de Puente Nacional, Santander (17).

### ***Materiales y métodos***

La toma de muestra, se realizó en la vereda Río Suárez del municipio de Puente Nacional – Santander, en temporada de lluvia.

**Figura 1.** Mapa ubicación geográfica vereda Río Suárez (Puente Nacional – Santander).

Localidad: Vereda Río Suárez  
Municipio: Puente Nacional, Santander.  
Latitud: 5.86111 Longitud: -73.6822



Fuente: [www.google.com.co/maps](http://www.google.com.co/maps) (18).

El agua para el estudio se recolectó en 10 botellas de plástico con capacidad para 3 litros, a las cuales se les realizó la preparación para examen microbiológico y la técnica de recolección se hizo conforme a la resolución 811 de 2008 y los protocolos establecidos en el manual de toma de muestras agua del Instituto Nacional de Salud (19). De cada una de las 10 muestras se recogió 3 litros y su distribución fue la siguiente: 3 de fuentes

naturales y 7 de las casas de la vereda, con el fin de relacionar las características del agua antes y después de entrar a la red de distribución en la vereda del río Suárez y se recolectó una muestra adicional de 1 litro, en frasco de plástico color ambar, facilitados por el laboratorio Hidrolab y debidamente preparado para el análisis físico químico que correspondió a la casa 1. Los puntos de muestreo se describen en la tabla 1.

**Tabla 1.** Puntos de muestreo.

No	Sitio de análisis fuente natural	Coordenada
1	Quebrada Otero	5° 49' 14.0" N 73° 40' 56.2" W
2	Quebrada Villamil	5° 50' 19.4" N 73° 41' 11.7" W
3	Quebrada la Angula	5° 51' 18.0" N 73° 41' 17.3" W
No	Sitio de análisis de viviendas	Coordenada
4	Casa 1 (Tomada del grifo)	5° 51' 25.0" N 73° 40' 57.7" W
5	Casa 2 (Tomada del grifo)	5° 48' 04.4" N 73° 41' 14.5" W
6	Casa 3 (Tomada del grifo)	5° 48' 04.9" N 73° 41' 14.2" W
7	Casa 4 (Tomada del grifo)	5° 49' 07.3" N 73° 40' 50.9" W
8	Casa 5 (Tomada del grifo)	5° 49' 07" N 73° 40' 51.2" W
9	Casa 6 (Tomada del grifo)	5° 49' 09" N 73° 40' 53" W
10	Casa 7 (Tomada del grifo)	5° 50' 03" N 73° 40' 58" W

**Fuente:** Elaboración propia.



**Figura 2.** Recolección de agua quebrada la Angula.



**Fuente:** Elaboración propia.

**Figura 3.** Recolección agua de grifo.



**Fuente:** Elaboración propia.

## ***Análisis físico-químico***

El análisis físico-químico se realizó teniendo en cuenta los parámetros establecidos en la Resolución 2115 de 2007 (20). La muestra se tomó de la casa 1 debido que es la primera vivienda en la que deriva la alimentación de las quebradas a la vereda Río Suárez y así determinar más claramente las características físico-químicas que tiene el agua al ingresar a la red de distribución. Este análisis se realizó en el laboratorio especializado en análisis de aguas Hidrolab.

## ***Análisis Microbiológico***

### *Filtración por membrana*

El método de filtración por membrana es altamente reproducible y es usado para el monitoreo de agua. El protocolo utilizado fue el establecido en el Standard Methods 9222 (21).

- El procedimiento se realiza bajo las normas de esterilidad y asepsia recomendadas. Se esterilizo todo el equipo de filtración, y se pasó 100 ml de agua destilada estéril para limpiar el equipo antes de iniciar el filtrado de las muestras, el agua destilada estéril se pasó, antes del procesamiento de cada muestra.
- Se ubica la membrana de 0.45 mm con unas pinzas estériles en el porta filtro del equipo y se coloca el embudo estéril.

- Se adicionan 100 ml de la muestra, previa homogenización y se inicia la filtración.
- Terminada la filtración se retira el embudo y se toma la membrana con una pinza estéril y se siembra en cada uno de los medios (ENDO, Bilis Esculina, Cetrimide y Sabouraud) previamente hidratados.
- Los medios se incubaron a 37°C por 24 horas

**Figura 4.** Llenado de embudos con el agua a analizar.



**Fuente:** Elaboración propia.



**Figura 5.** Equipo de filtración.



**Fuente:** Elaboración propia.

**Figura 6.** Hidratación de los medios con agua destilada estéril.



**Fuente:** Elaboración propia.

### *Recuento de UFC*

La obtención del número de unidades formadoras de colonias se realizó mediante cuenta colonias digital.

### *Aislamiento y coloración de Gram*

Se escogieron las colonias presuntivas de coliformes, las no fermentadoras de lac-

tosa y las presuntivas de hongos, las cuales fueron repicadas en agar sangre, agar MacConkey, agar King B, agar Tripticasa Soya y agar PDA, para obtener los microorganismos puros. De igual forma se les realizó la coloración de Gram.

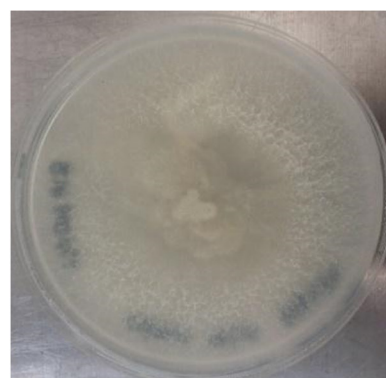
**Figura 7.** Aislamiento de colonias puras.



Agar MacConkey



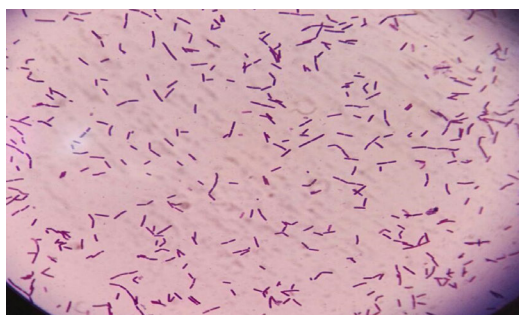
Agar Tripticasa Soya



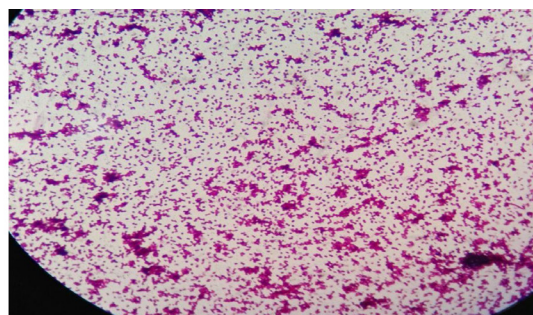
Agar PDA

**Fuente:** Elaboración propia.

**Figura 8.** Coloración de Gram aumento 100x.



Bacilos Gram +



Cocos Gram +

**Fuente:** Elaboración propia.

### *Identificación bioquímica*

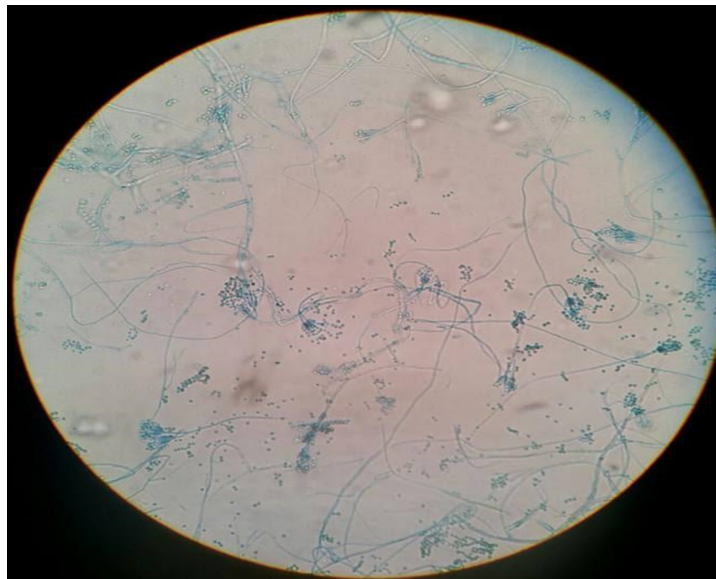
La identificación bioquímica de las bacterias aisladas se realizó por el método BD BBL Crystal™ para Gram positivos y Gram negativos.

las claves dicótomas teniendo en cuenta sus características microscópicas con la tinción de azul de lactofenol para identificar las estructuras micóticas y macroscópicas como aspecto de la colonia, color y micelio, entre otros.

### *Identificación de hongos*

La identificación de género y posible especie de los hongos aislados se realizó mediante

**Figura 9.** Tinción Azul de Lactofenol aumento 40x.



Penicillium spp

**Fuente:** Elaboración propia.

## **Resultados**

### *Análisis fisicoquímico*

Los resultados obtenidos a partir de los análisis físico-químicos realizados por el labo-

ratorio especializado Hidrolab se describen en la tabla 2, en la cual se observan los parámetros analizados y los valores máximos aceptables establecidos en la resolución 2115 de 2007.

**Tabla 2.** Resultados de los parámetros físico-químico evaluados y valores máximos aceptables.

Parámetro	Resultados	Valor máximo aceptable
Cloruros	< 3.0 mg/L	250 mg/L
pH	7.21 (19.3°C)	6.5 – 9.0
Sulfato	<1 mg/L	250 mg/L
Hierro	0.47 mg/L	0.3 mg/L
Alcalinidad	12mg/L	200 mg/L
Color aparente	5 (pH: 6.56)	15 UPC
Conductividad	50 S/cm	1000 S/cm
Dureza total	12.6 mg/L	300 mg/L
Turbiedad	12.6 UNT	2 UNT

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados muestran una cuantificación de hierro por encima del valor máximo aceptable, así como el nivel de turbiedad inadecuado que pueden afectar el sabor y el aspecto del agua.

### *Análisis Microbiológico*

Dentro de las muestras se observó un alto recuento de *Streptococcus* del grupo D, en el medio bilis esculina, dato que se obtuvo en todos los puntos del muestreo con un número >300 UFC/100 ml.

En medio cetrimide se observó recuento >300 UFC/100 ml en todos los puntos

muestreados indicando alta probabilidad de la presencia del género *Pseudomonas*.

En el medio ENDO se identificaron coliformes con crecimiento >300 UFC/100 ml

El recuento de hongos más alto se obtuvo en la casa 1 con 240 UFC/100 ml.

En la tabla 3, se observan los recuentos bacterianos y micóticos obtenidos en cada uno de los puntos de muestreo.

**Tabla 3.** Recuento bacteriano y micótico en UFC/100 ml del Río Suárez con relación a lo establecido en la Resolución 2115 de 2007 (menor de 0).

PUNTOS DE MUESTREO	ENDO (Coliformes)	BILIS ESCULINA ( <i>Streptococcus</i> del grupo D)	CETRIMIDE ( <i>Pseudomonas</i> )	SABOURAUD (Hongos)
Quebrada 1	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml
Quebrada 2	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml
Quebrada 3	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	180 UFC/100 ml
Casa 1	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	240 UFC/100 ml
Casa 2	220 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	120 UFC/100 ml

PUNTOS DE MUESTREO	ENDO (Coliformes)	BILIS ESCULINA (Streptococcus del grupo D)	CETIMDE (Pseudomonas)	SABOURAUD (Hongos)
Casa 3	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	120 UFC/100 ml
Casa 4	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	160 UFC/100 ml
Casa 5	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	88 UFC/100 ml
Casa 6	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	72 UFC/100 ml
Casa 7	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	>300 UFC/100 ml	108 UFC/100 ml

**Fuente:** Elaboración propia.

**Tabla 4.** Microorganismos identificados por la técnica BD BBL Crystal™.

PUNTOS DE MUESTREO	MICROORGANISMOS AISLADO
Quebrada 1	Bacillus subtilis Pseudomonas aeruginosa
Quebrada 2	Corynebacterium bovis Escherichia coli
Quebrada 3	Serratia marcescens
Casa 1	Bacillus cereus
Casa 2	Aerococcus urinae
Casa 3	Streptococcus bovis Escherichia coli
Casa 4	Micrococcus sedentarius
Casa 5	Enterobacter cloacae Serratia marcescens
Casa 6	Escherichia coli Streptococcus bovis
Casa 7	Escherichia coli Klebsiella oxytoca

**Fuente:** Elaboración propia.

### Calculo del IRCA

Los parámetros alterados que indican el índice de riesgo del agua están estipulados en el Artículo 14 de la Resolución 2115 del 2007.(20)

El cálculo del Índice de Riesgo de la Calidad del Agua (IRCA) para consumo humano, se obtiene mediante la siguiente formula:

$$IRCA = \frac{\text{Sumatoria del puntaje de los parámetros alterados}}{100} \times 100$$

**Tabla 5.** Parámetros alterados identificados de importancia en el índice de riesgo de la calidad del agua de la vereda Río Suárez.

Parámetro	Puntaje de riesgo
Turbiedad	15
Hierro	1.5
Coliformes Totales	15
<i>E. coli</i>	25

**Fuente:** Elaboración propia.

**Tabla 6.** Clasificación según el IRCA (Índice de Riesgo de la Calidad de Agua) por muestra.

Muestra	Parámetros	Puntaje de riesgo IRCA	Clasificación según el IRCA
Casa 1	Turbiedad Hierro Coliformes totales	31.5	Medio
Casa 2	Coliformes totales	15	Medio
Casa 3	<i>E.coli</i> Coliformes totales	40	Alto
Casa 4	Coliformes totales	15	Medio
Casa 5	Coliformes totales	15	Medio
Casa 6	Coliformes totales <i>E.coli</i>	40	Alto
Casa 7	Coliformes totales <i>E.coli</i>	40	Alto


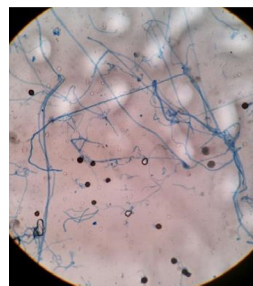

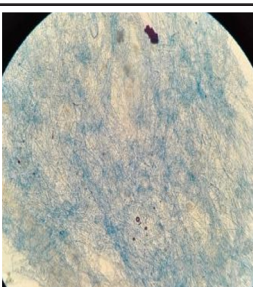

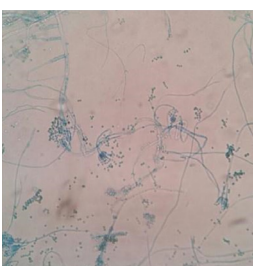
**Fuente:** Elaboración propia.

La resolución 2115 de 2007, establece que el agua de consumo humano con un porcentaje de clasificación IRCA entre 35.1% y 80% se cataloga como un índice de riesgo alto y un puntaje entre 14.1% a 35% corresponde a un índice de riesgo medio,

por lo tanto se debe notificar a la autoridad sanitaria correspondiente inmediatamente. Los hongos aislados en medio PDA pertenecen al phylum Ascomycota, los cuales se clasifican como microorganismos ambientales.



**Tabla 7.** Identificación de hongos .

Identificación de hongos Mucorales				
	Características macroscópicas		Características microscópicas	
<i>Rhizopus</i> spp		Colonias de crecimiento rápido, algodonosas, al principio de color blanco y luego grisáceo o amarillento. Se observan puntos negros Es de uso industrial en fermentación y producción de ácidos orgánicos y enzimas.		Hifas hialinas no septadas Rizoide E esporangióforo E sporangio esférico E esporas pigmentadas
<i>Mucor</i> spp		Colonias algodonosas de color blanco de crecimiento rápido 4 días		Hifas hialinas no septadas E esporangióforo E esporangio esférico E esporangioesporas Columela
Identificación de hongos Deuteromycetes				
	Características macroscópicas		Características microscópicas	
<i>Penicillium</i> spp		Colonias blanquecinas de aspecto granulosos o polvoriento, crece rápido 4 días se usa en la elaboración de antibióticos y como control biológico post cosecha.		Hifas septadas hialinas Conidióforo Métula Fiálide Conidias

**Fuente:** Elaboración propia.

## Discusión

Este estudio es el primer acercamiento a la evaluación fisicoquímica y microbiológica de la calidad del agua para consumo humano

en la vereda Río Suárez (Puente Nacional, Santander), se seleccionó este punto en el trayecto del Río Suárez porque el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM) no registra ningún



antecedente de estudio, esta agua no recibe ningún tratamiento y abastece a cerca de 1000 personas habitantes de la vereda Río Suárez.

El análisis físico químico evidenció que el hierro está por encima de lo permitido, según lo establece la resolución 2115 de 2007. De acuerdo con estudios realizados la concentración de hierro elevada puede afectar el sabor del agua, producir manchas indelebles sobre los artefactos sanitarios y la ropa blanca. El hierro en solución contribuye con el desarrollo de microorganismos que pueden formar depósitos de óxido férrico en la red de distribución (22) y se asocia con alteraciones en la turbiedad del agua (23). Un estudio con resultados similares fue realizado en aguas subterráneas de la provincia del Chaco Argentina donde encontraron que la mayoría de las muestras tenían una concentración promedio de 0.44 mg/L de hierro, mostrando la posibilidad que al filtrarse el agua por el suelo y piedras puede desprender sustancias, disolver minerales y así corroer las tuberías de distribución del agua (24).

Los procesos de microfiltrado se utilizan para disminuir los niveles de turbiedad del agua, esto se demuestra en un estudio realizado en el municipio de Bojacá, Cundinamarca cuyos resultados arrojaron niveles de turbiedad normales en donde se utilizó este método (25), a comparación de los resultados obtenidos en este estudio en el cual los niveles de turbiedad superan ampliamente el valor establecido en la resolución 2115 de

2007 (2 unidades nefelométricas de turbiedad UNT) con 12.6 UNT, lo cual se debe posiblemente a la presencia de partículas en suspensión o coloides como arcillas, limo, tierra finamente dividida y la presencia de microorganismos (22), la turbiedad ha sido una característica ampliamente aplicada como criterio de calidad del agua, tanto en las fuentes de abastecimiento como en los procesos de potabilización y sistemas de distribución (26).

Los coliformes totales pertenecen a un grupo de microorganismos utilizados como indicadores de contaminación de aguas, su hallazgo indica un impacto negativo en la calidad sanitaria del agua (27). Los datos obtenidos en el recuento de coliformes totales en las aguas de la vereda Río Suárez, superan los valores aceptables establecidos en la resolución 2115 de 2007, la presencia de estos microorganismos en el agua podrían ser causa de graves problemas de salud de tipo urinario, gastrintestinal y de piel entre otros.

En todas las muestras se aislaron microorganismos presuntivamente patógenos como *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, que se pueden hallar en la flora intestinal tanto humana como animal (28, 29).

El índice de riesgo de la calidad del agua para consumo humano (IRCA), calculado en el presente estudio obtuvo puntajes que la clasifican entre riesgo medio y alto. En todas las muestras se encontraron coliformes totales en elevadas concentraciones

y *E. coli* solo en el agua de tres viviendas (casa 3, casa 6 y casa 7) que otorga mayores puntajes para clasificarlas como agua de alto riesgo para el consumo humano según el Índice de Riesgo de la Calidad del Agua (IRCA) con una valoración de 40 que podría indicar contaminación fecal; las casas 2, 4 y 5 se clasificaron como aguas de riesgo medio para el consumo humano ya que solo tuvieron el puntaje asignado a Coliformes totales según la resolución 2115 de 2007. Es de anotar que en una de las muestras provenientes de origen (quebrada Villamil -muestra 2), se encontró *E. coli*.

Según lo establecido en la normatividad al obtener puntajes de medio y alto riesgo en aguas para uso y consumo humano, se debe informar a la persona o ente prestador del servicio, COVE, Alcaldía y / o Gobernación.

En este estudio se identificaron otras bacterias como *Serratia marcescens*, la cual se encuentra en tierra y medio ambiente (30), *Pseudomonas aeruginosa* se ha visto asociada a infecciones nosocomiales, pero también se puede encontrar en el medio ambiente, en vegetales y frutas (31), *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* se han encontrado en medio ambiente principalmente, aunque también en agua y tierra (32), *Corynebacterium bovis*, *Aerococcus urinae* y *Streptococcus porcinus* son bacterias que probablemente estén asociadas a la presencia de animales cerca de las fuentes que abastecen la población como bovinos, porcinos y aves, estas bacterias pueden llegar a causar endocardi-

tis y bacteremias, en personas con predisposición (33-35). *Micrococcus sedentarius* se puede encontrar como saprofito ambiental y en la piel (36) y *Enterobacter cloacae* que se encuentra principalmente como microbiota normal del tracto digestivo, también puede provocar infecciones del aparato urinario y en algunos casos bacteremia (37), esto podría indicar que la contaminación puede provenir de diversas fuentes ambientales como los cultivos de frutas hallados en las orillas de las quebradas, tierra y vegetales; algunos microorganismos pueden provenir de fuentes animales, ya que también se observó la presencia de animales de pastoreo que pueden contaminar indirectamente el agua con sus desechos orgánicos como excremento y orina.

La presencia de las bacterias nombradas anteriormente puede ocasionar múltiples, afecciones en la salud humana como infecciones de tipo gastrointestinal, de piel, heridas, vías respiratorias y urinarias entre otras, sobre todo en individuos inmunosuprimidos y convertirse en un problema serio en la salud pública.

En la vereda Río Suárez existen siembras de cultivo de lulo y fresa a las orillas de las quebradas, en las cuales se observó que no hay un control en el desecho de las frutas en descomposición que se acumulan a la orilla de las quebradas, pudiendo ser causa de la presencia de hongos de origen ambiental como *Mucor* spp y *Rhizopus* spp, en el agua, situación que a su vez podría facilitar la dispersión de las conidias. Los hongos iden-

tificados en el estudio no se asocian con enfermedad en el humano, pero si con la fruticultura, a este respecto Fraire-Cordero en su estudio “Hongos Patógenos en Fruto de Fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en Postcosecha” demuestra cómo se involucran los hongos ambientales en los procesos de pudrición de la fruta en especial fresa, algunos de los microorganismos aislados en su estudio fueron *Aspergillus*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phytophthora*, y *Rhizopus stolonifer*; identificados como hongos saprofiticos (38) y por su parte Koike & Bolda, en su estudio pudrición de fruta por *Rhizopus* y *Mucor* en la fresa, muestran resultados similares (39)

## Conclusiones

La evaluación realizada a las características microbiológicas y físico-químicas del agua de la vereda Río Suárez de municipio de Puente Nacional-Santander, evidencio que en todos los puntos de muestreo los parámetros estudiados sobrepasan los rangos normales aptos para que el agua pueda ser utilizada con seguridad por la población.

El análisis físico-químico dio a conocer que el agua en estudio presenta valores de hierro mayor a 0.3 mg/L y turbiedad mayor a 2 UNT, los cuales pueden afectar el sabor y el aspecto del agua respectivamente.

Los análisis realizados con el método filtración por membrana, demostraron recuentos microbiológicos mayores a 0 UFC/100 ml de acuerdo a la Resolución 2115 de 2007.

En el análisis microbiológico se confirmó la presencia de bacterias como *Escherichia coli*, *Aerococcus urinae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* que son potencialmente patógenos y se asocian con infecciones gastrointestinales, de piel y urinarias, entre otras.

Se identificaron hongos como *Rhizopus* y *Mucor*, estos hongos se encuentran en el ambiente y son causantes de pudrición de frutas que al ser utilizadas para riego de huertas caseras pueden transmitir los hongos.

Al desarrollar la formula representativa del IRCA, se determinaron valores de 31.5, 15, 40, 15, 15, 40 y 40 que clasificaron el agua de la vereda Río Suárez en el rango de alto y medio, dando como resultado agua no apta para consumo humano de acuerdo al Decreto 1575 de 2007 y la Resolución 2115 de 2007.

## Referencias

1. Neuronas PEc. portaleducativo.net. [Online].; 2018 [citado el 7 de marzo de 2019]. Disponible en: <http://www.portaleducativo.net/tercero-basico/785/Los-Rios>
2. IDEAM - Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Hidrología. [Online]. 2018 [citado el 10 de marzo de 2019]. Disponible en <http://www.ideam.gov.co/web/atencion-y-participacion-ciudadana/hidrologia>.

3. Corrales L, Sánchez L, Escucha F. Determinación de la presencia de bacterias patógenas para el humano en aguas de riego en la cuenca alta de la sabana de Bogotá; D.C. Colombia. NOVA 2014 vol 12, núm 22, p 179 – 186.
4. OMS. Guías para la Calidad del Agua Potable. Gideon: OMS, Missouri; 2006.
5. Programa de las naciones unidas para el desarrollo; OMS. Programa de las naciones unidas para el desarrollo. 1989.
6. Organización Mundial de la Salud. Organización Mundial de la Salud. [Online].; 2006 [citado el 1 abril de 2019]. Disponible en: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/guidelines/es/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/guidelines/es/)
7. LENNTECH. LENNTECH. [Online]. 2019 [citado el 1 de abril de 2019]. Disponible en: <http://www.lennotech.es/aplicaciones/potable/normas/estandares-europeos-calidad-agua-potable.htm>
8. EPA. [Online].; 2016 [citado el 4 de abril de 2019]. Disponible en: <http://www.epa.gov/watertrain>
9. García A. Colombia País Maravilloso. In Codazzi IgA, editor. Colombia País Maravilloso.
10. Esquema de ordenamiento territorial municipio de Guavata- Santander. Santander: Universidad Industrial de Santander; 2003.
11. Rojas JR. incoder. [Online].; 2012 [cited 2018 marzo 8]. Available from: [http://www.incoder.gov.co/documentos/Estrategia%20de%20Desarrollo%20Rural/Pertiles%20Territoriales/ADR\\_HOYA%20RIO%20SUAREZ/Perfil%20Territorial/CARACTERIZACION%20SOCIO-DEMOGRAFICA%20HOYA%20DEL%20RIO%20SUAREZ.pdf](http://www.incoder.gov.co/documentos/Estrategia%20de%20Desarrollo%20Rural/Pertiles%20Territoriales/ADR_HOYA%20RIO%20SUAREZ/Perfil%20Territorial/CARACTERIZACION%20SOCIO-DEMOGRAFICA%20HOYA%20DEL%20RIO%20SUAREZ.pdf)
12. Nullvalue. RÍO SUÁREZ FOCO DE INFECCIÓN. El Tiempo. 1996 febrero 2.
13. Vega WF. Un torrente de aguas negras. El Tiempo. 2005 Enero 16.
14. Universidad Industrial de Santander CdER. esquema de ordenamiento territorial de Barbosa. síntesis. barbosa: Universidad Industrial de Santander, Centro de Estudios Regionales; 2009.
15. Pinto PA. vanguardia.com. [Online]. Puente Nacional; 2012 [cited 2018 marzo 8]. Available from: <http://www.vanguardia.com/santander/velez/145147-alarma-por-contaminacion-del-agua-que-abastece-a-puente-nacional>
16. Peña PC. hsbnoticias.com. [Online].; 2014 [cited 2018 marzo 8]. Available from: <http://hsbnoticias.com/noticias/nacional/alerta-por-derrame-de-petr%C3%B3leo-en-r%C3%ADo-suarez-100929>.
17. IDEAM – CorpoMagdalena. Estudio ambiental de la cuenca Magdalena – Cauca y elementos para su ordenamiento territorial. Bogotá. 2001
18. Google.com. [Online].; 2016 [cited 2018 marzo 5]. Available from: <https://www.google.com.co/maps/place/Vda.+Rio+Suarez,+Puente+Nacional,+Santander/@5.9334123,-73.6378885,12z/data=!4m2!3m1!1s0x8e41e85ea6735ec9:0x1086c2c35176f36b>.
19. Instituto Nacional de Salud I. Instituto Nacional de Salud. [Online].; 2011 [cited 2018 Abril 20]. Available from: [http://www.ins.gov.co/sivicap/Normatividad/2011%20Manual%20toma%20de%20muestras%20agua.pdf?Mobile=1&Source=%2Fsivicap%2F\\_layouts%2Fmobile%2Fview.aspx%-3FList%3Ddc462e4b-5de8-4a2f-be3a-08ad1c-837db7%26View%3D0ac5f5c5-4988-442d-bc0e-2c07af4f66a5%26CurrentPage](http://www.ins.gov.co/sivicap/Normatividad/2011%20Manual%20toma%20de%20muestras%20agua.pdf?Mobile=1&Source=%2Fsivicap%2F_layouts%2Fmobile%2Fview.aspx%-3FList%3Ddc462e4b-5de8-4a2f-be3a-08ad1c-837db7%26View%3D0ac5f5c5-4988-442d-bc0e-2c07af4f66a5%26CurrentPage).
20. Ministerio de la Protección Social MDAVYDT. Resolución Número 2115 de 2007. In Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano; 2007; Bogota. p. 1 - 8.
21. APHA WA. American Public Health Association (APHA). 1998. APHA (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition, American Public Health Association/ American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC.
22. McFarland ML. [Online].; 2013 [cited 2018 Abril 26]. Available from: <http://texaswater.tamu.edu/resources/factsheets/15451sironandman.pdf>.

23. Martel AB. Aspectos fisicoquímicos de la calidad del agua. [Online].; 2012 [cited 2018 Marzo 26]. Available from: <http://www.bvsde.paho.org/bvsatr/fulltext/tratamiento/manualI/tomoI/uno.pdf>.
24. Giménez P. Evaluación de los Niveles de Hierro y Arsénico en Aguas Naturales Subterráneas de la Región Centro-Oeste de la Provincia del Chaco - Argentina. *informacion tecnologica*. 2006; 17(3).
25. Sandra Monica E. Calidad físicoquímica microbiológica del agua del municipio de Bojacá, Cundinamarca. NOVA. 2010; 8(14).
26. Carolina Montoya DLPTCHCJCE. Efecto del incremento en la turbiedad del agua cruda sobre la eficiencia de procesos convencionales de potabilización. 2011 Diciembre; 57(16).
27. Gómez F. Distribución de dos Indicadores bacterianos de calidad de agua en el Golfo de Uraba. 2008 Diembre; 11(3).
28. A J. Escherichia coli: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012; 4(3).
29. C V. Epidemiology of Klebsiella oxytoca-Associated Diarrhea Detected by Simmons Citrate Agar Supplemented with Inositol, Tryptophan, and Bile Salts. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012 mayo; 50(5).
30. Mahlen SD. Serratia Infections: from Military Experiments to Current Practice. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011; 24(4).
31. Soberón G. *biblioweb.tic.unam*. [Online]. [cited 2018 Marzo 2]. Available from: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap3/>.
32. Zúñiga P. Caracterización Fisiológica de Cepas de Bacillus spp. aisladas de la Rizósfera de Papa (Solanum tuberosum). *Ecologia Aplicada*. 2010; 9(1).
33. *www.criver.com*. [Online]. Available from: [http://www.criver.com/files/pdfs/infectious-agents/rm\\_ld\\_r\\_corynebacterium\\_bovis.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/infectious-agents/rm_ld_r_corynebacterium_bovis.aspx).
34. Humphries RM. In Vitro Antimicrobial Susceptibility of Aerococcus urinae. *Journal of Clinical microbiology*. 2014; 52(6).
35. Facklam R. Identification of Streptococcus porcinus from Human Sources. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995 febrero; 33(2).
36. Sáenz Anduaga L. Infecciones Cutáneas Bacterianas. Servicio de Dermatología Hospital Militar Central. Lima, Perú. 2006; 16(1).
37. *ecured.cu*. [Online]. [cited 2018 Marzo 2] Available from: [https://www.ecured.cu/Enterobacter\\_cloacae](https://www.ecured.cu/Enterobacter_cloacae).
38. Fraire-Cordero MdL. Hongos Patógenos en Fruto de Fresa (Fragaria x ananassa. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2003 Octubre; 21(3): p. 285.
39. Steven T. Koike & Mark Bolda. Guía de Producción significado de los numerosos patógenos que causan enfermedades en la fruta . [on line] [cited 2018 agosto 6] Available from: <https://ucanr.edu/blogs/fresamora/blogfiles/37849.pdf>

# Producción de astaxantina bajo factores de estrés utilizando un biorreactor a escala de laboratorio de 5 L

Astaxanthin production under stress factors using a 5L laboratory scale bioreactor

Ana Graciela Lancheros Díaz<sup>1</sup>, Luis Eduardo Díaz Barrera<sup>2</sup>, Judith Elena Camacho Kurmen<sup>3</sup>

## Resumen

**Introducción.** *Haematococcus pluvialis* es una microalga que produce astaxantina, un beta-caroteno y antioxidante muy usado en la industria. Para obtener una mayor producción de astaxantina se planteó como objetivo utilizar diferentes factores de estrés, en un biorreactor a escala de laboratorio de 5 litros. **Metodología.** Se cultivó la microalga en el medio RM, pH 6,8, temperatura  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , aire filtrado, iluminación con lámparas blancas 20h luz/4h oscuridad, irradianza  $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , diferentes concentraciones de acetato de sodio y cloruro de sodio. Se determinó crecimiento celular, cambios morfológicos y cuantificación de astaxantina y clorofila por espectrofotometría. Se realizó un análisis estadístico utilizando ANOVA (95%). **Resultados.** Utilizando 0,299 mg/L de acetato de sodio se obtuvo un crecimiento celular de  $2,0 \times 10^4$  Cel/mL y una concentración de astaxantina de 2,530  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que con 1,6 mg/L de acetato de sodio el crecimiento celular fue de  $3,5 \times 10^4$  Cel/mL y una concentración de astaxantina de 1,9  $\mu\text{g/mL}$ . El tratamiento al cual se le adicionó 1,6 g/L de acetato de sodio y 6,4 g/L de cloruro de sodio presentó la mayor producción astaxantina 7,3  $\mu\text{g/mL}$ . El tratamiento con acetato de sodio 0,320 g/L + cloruro de sodio 1,28 g/L presentó el mayor crecimiento celular con  $1,64 \times 10^5$  células/mL. **Conclusión.** Esta investigación destaca la importancia de cultivar inicialmente la microalga utilizando el biorreactor Tecferm de 5 litros y después de su fase exponencial someterla a factores de estrés con acetato de sodio y cloruro de sodio lográndose así la mayor producción de astaxantina 7,325  $\mu\text{g/mL}$ .

**Palabras claves:** microalgas, crecimiento celular, estrés, betacaroteno, clorofila, acetato de sodio.

1. CvLAC: [https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod\\_rh=0000482730](https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000482730)  
Google Scholar: [https://scholar.google.com/citations?view\\_op=list\\_works&hl=es&user=nLa\\_f7UAAAAJ](https://scholar.google.com/citations?view_op=list_works&hl=es&user=nLa_f7UAAAAJ)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5799-0282>

2. CvLAC: [http://scienti.colciencias.gov.co:8081/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod\\_rh=0000059498](http://scienti.colciencias.gov.co:8081/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000059498)  
Google Scholar: [https://scholar.google.com/citations?user=0tS\\_Nr8AAAAJ&hl=es](https://scholar.google.com/citations?user=0tS_Nr8AAAAJ&hl=es)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9588-9935>

3. CvLAC: [https://scienti.colciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod\\_rh=0000421863](https://scienti.colciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000421863)  
Google Scholar: <https://scholar.google.com/citations?user=kdOccMIAAAAJ&hl=en>  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8880-1501>



## Abstract

**Introduction.** *Haematococcus pluvialis* is a microalgae that produces astaxanthin, a beta-carotene and antioxidant widely used in industry. In order to obtain a higher production of astaxanthin, the objective was to use different stress factors, in a 5-liter laboratory-scale bioreactor. **Methodology.** The microalgae was cultivated in the RM medium, pH 6.8, temperature  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , filtered air, illumination with white lamps 20h light/4h darkness, irradiance  $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , different concentrations of sodium acetate and chloride of sodium. Cell growth, morphological changes and quantification of astaxanthin and chlorophyll were determined by spectrophotometry. Statistical analysis was performed using ANOVA (95%). **Results.** Using 0.299 mg/L of sodium acetate a cell growth of  $2.0 \times 10^4$  Cel/mL and an astaxanthin concentration of 2.530  $\mu\text{g/mL}$  were obtained, while with 1.6 mg/L of sodium acetate the cell growth It was  $3.5 \times 10^4$  Cel/mL and an astaxanthin concentration of 1.9  $\mu\text{g/mL}$ . The treatment to which 1.6 g L of sodium acetate and 6.4 g/L of sodium chloride were added showed the highest astaxanthin production, 7.3  $\mu\text{g/ml}$ . Treatment with 0.320 g/L sodium acetate + 1.28 g/L sodium chloride showed the highest cell growth with  $1.64 \times 10^5$  cells/ml. **Conclusion.** This research highlights the importance of initially cultivating the microalgae using the 5-liter Tecferm bioreactor and, after its exponential phase, subjecting it to stress factors with sodium acetate and sodium chloride, thus achieving the highest production of 7.325  $\mu\text{g / ml}$  astaxanthin.

**Keywords:** microalgae, cell growth, stress, beta-carotene, chlorophyll, sodium acetate.

## Introducción

Dentro de la biodiversidad se encuentran las microalgas que son fuente de un gran número de compuestos bioactivos de interés industrial, como los carotenoides que se utilizan como colorantes naturales en alimentación animal y humana, así como en la industria farmacéutica, cosmética y en la acuicultura. Además, se han propuesto como agentes efectivos en la prevención de una variedad de enfermedades, debido a su capacidad antioxidante, inmunoreguladora, anti-inflamatoria y anti-cancerígena.

El cultivo de microalgas también tiene la capacidad de metabolizar los nutrientes del medio en donde habitan, los cuales se utilizan para la biorremediación de aguas residuales que son productos derivados de la actividad industrial, doméstica y la explotación agropecuaria, los cuales no deben ser vertidos directamente a los cuerpos de agua debido a los problemas sanitarios que puedan generar. Se tiene como ejemplo el Cr VI que es un elemento tóxico y con potencial carcinógeno el cual debe ser removido de todo tipo de desecho industrial antes de su disposición final en ríos y rellenos



sanitarios por lo que la implementación de métodos microbiológicos puede darle un nuevo enfoque a los métodos de reducción utilizados actualmente (28).

El alga unicelular *H. pluvialis* ha sido estudiada exhaustivamente debido a su capacidad para acumular astaxantina y otros carotenoides relacionados. La acumulación de este carotenoide en la microalga está relacionado con la evolución de diferentes etapas de la célula vegetativa a la aplanospora en el ciclo de la microalga, pero esta transición solo se da cuando esta ha sido sometida a diferentes condiciones de estrés. Actualmente se conocen diferentes condiciones de estrés como limitación de nitrógeno, deficiencia de magnesio, alta intensidad de luz, falta de fósforo y estrés salino, las cuales han demostrado ser una fuente importante de carbono, lo que mejora el crecimiento y la carotenogénesis, ya que afectan la ruta de la fotosíntesis y aumentan la expresión genética de la enzima BKT.

La realización de este proyecto pretende aprovechar los avances de la ciencia y la tecnología basados en la utilización de las propiedades de los organismos en particular en los niveles celular y subcelular, para generar y adaptar tecnologías que permitan obtener compuestos bioactivos a través de bioprocesos. Es por esto que una estrategia promisorio para mejorar la producción de astaxantina en el *H. pluvialis*, es el estudio de las rutas metabólicas y su regulación, con el fin de optimizar las condiciones de crecimiento, su desarrollo y producción, ya

que la utilización del *H. pluvialis* tiene sus dificultades en el momento del cultivo y de obtener el pigmento en cantidades de interés debido a su ciclo celular complejo. Uno de los principales inconvenientes es que se trata de un producto del metabolismo secundario. Durante el crecimiento activo, no se produce síntesis de astaxantina, solo cuando cesa la división celular se inicia su síntesis y se acumula en grandes cantidades.

*H. pluvialis* tiene también unas tasas de crecimiento bajas lo que debilita sus posibilidades de uso como fuente natural del pigmento, además es susceptible a la contaminación. Estas características requieren cultivos en sistemas cerrados, los cuales ofrecen ventajas como mejor control del cultivo, protección de la contaminación ambiental y producción de gran cantidad de biomasa, así como el desarrollo de un medio de cultivo óptimo para su crecimiento ya que el uso de una adecuada tecnología de cultivo incrementa la producción de biomasa hasta niveles óptimos para la producción del pigmento. De igual forma, un mayor entendimiento de las bases moleculares de la relación -condiciones de estrés-inducción- acumulación de astaxantina en *H. pluvialis*, podría ser útil para aumentar la productividad de astaxantina.

Es por esto que la presente investigación busca producir astaxantina, ya que actualmente se sintetiza químicamente y esta forma sintética es de alto costo 2500 dólares por kilogramo, además esta ha sido prohibida en el mercado por la Administración

de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) debido a su baja biodisponibilidad y seguridad. Estas preocupaciones son debidas a la estereoquímica diferente y el potencial arrastre de los intermedios de síntesis, haciendo que la astaxantina natural de *H. pluvialis* sea una buena opción de buena calidad frente a la forma química y con respecto a los otros microorganismos que son capaces de producirla.

## Materiales y métodos

### Proceso de escalamiento

**Microorganismo:** *Haematococcus pluvialis* UTEX, cepa de referencia (colección de cultivos de algas, Universidad de Texas, Austin TX, USA). Se mantuvo la cepa en medio sólido y líquido Volvox-MES (sugerido por la UTEX), a baja irradianza, temperatura 15 – 20°C.

La activación de la cepa se realizó en medio líquido Volvox-MES, a baja irradianza y temperatura ambiente.

### Monitoreo de las células del *H. pluvialis* durante el cultivo

Para control de calidad de la cepa y del cultivo, se tuvo en cuenta que se trabajó con una cepa de referencia de la UTEX, la cual se encuentra caracterizada previamente. Para ver pureza de la cepa y del cultivo se

monitoreó, utilizando un microscopio para determinar el color, tamaño, viabilidad y morfología de las células y con cámara de Neubauer se determinó el promedio de número de células y tamaño celular. Además se realizó control del pH.

### Preparación del Inoculo

Para preparar el inoculo se tomó una muestra de la solución stock de la cepa de referencia de la UTEX y se transfirió asépticamente a un erlenmeyer de 500 ml que contenía 200 ml de medio Volvox-MES fresco (Tabla No 1) y estéril bajo continua iluminación, CO<sub>2</sub> 5% en aire, agitación continua a 25°C por 4 días. Para todos los experimentos un cultivo de 4 días fue usado como el inoculo (en la fase exponencial de crecimiento).

Para establecer la cantidad de inoculo a utilizar se hizo un conteo celular y con esta información se procedió a realizar los cálculos necesarios para saber el volumen a adicionar del inoculo a los reactores en sistema batch.

**Tabla 1.** Composición de medio MES volvox (29)

MEDIO VOLVOX-MES (UTEX)	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	11,8 g/100 ml H <sub>2</sub> O
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4 g/100 ml
Na <sub>2</sub> glicerofosfato · 5H <sub>2</sub> O	0,05 G/L
KCl	0,05G/L
MES	1,95 G/L
PIV METAL SLN.	6 ml/L
NH <sub>4</sub> Cl	0,026 G/l
Vitamina B12	1ml/L H <sub>2</sub> O
HEPES buffer	
BIOTINA	1 ml/L
pH 6,7	

**Fuente:** García Martin Laura (5).

### *Sistema de cultivo*

Se realizó el cultivo de *H. pluvialis* en el biorreactor TEC – FERM a escala de laboratorio de 5 litros en sistema batch en el medio RM.

### *Condiciones de cultivo*

Condiciones estándar: pH 7, ciclo luz/oscuridad 20h: 4h, temperatura 25°C, agitación continua, CO<sub>2</sub> 5% en aire, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips). El proceso se desarrolló bajo condiciones normales del medio y ciclo luz/oscuridad 18h: 6h y condiciones de estrés con concentraciones de acetato de sodio y acetato de sodio + cloruro de sodio en mg/L.

El medio RM estéril con el pH ajustado se adicionó al biorreactor hasta un volumen de 2 Litro (Figura 1).

- Se procedió a adicionar el inóculo de la microalga al 10% (1x 10<sup>4</sup> Células/ml).
- Se realizó el montaje bajo las condiciones establecidas.
- Toma de muestra cada tercer día en forma aséptica.
- Conservación de las muestras en solución formosalina (1:9), en una proporción 1:1, se tomaron 500 µl y se realizó control del cultivo (conteo celular y morfología) y el resto de muestra se utilizó para medición de pH.

- Se llevó control de temperatura, pH, agitación, CO<sub>2</sub> en aire, ciclo luz/oscuridad, medios.
- Tiempo del estudio 20 – 40 días

### ***Fase 1 Crecimiento de H. Pluvialis:***

Se evaluó el crecimiento de *H. pluvialis* UTEX 2505 bajo las condiciones de cultivo establecidas como medio RM, pH 6.8, ciclo luz/oscuridad 16h: 8h, temperatura 20±2°C, agitación manual una vez al día durante 10 segundos, iluminación con lámparas fluorescentes blancas (Tlt 20w/54RS marca Philips), irradianza de 70 µE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> y aire filtrado. Las condiciones de estrés utilizadas fueron estrés salino usando diferentes concentraciones de acetato y cloruro de sodio, combinándolas con luz blanca alta. Se realizó conteo celular en Cámara de Neubauer por triplicado. Se realizó curva de crecimiento a partir de los resultados. Se aplicó modelo logístico por Dmfit.

***Fase 2 Cambios morfológicos celulares.*** Se realizó el monitoreo de la microalga utilizando un microscopio de luz para determinar el color, tamaño, viabilidad y morfología de las células, realizando registro fotográfico a 10x y 40x.

***Fase 3 Cuantificación de astaxantina y clorofila.*** Se utilizó método APHA, 1992. Análisis estadístico de los datos. Se realizó un análisis de varianza ANOVA (95%) para ver diferencias significativas entre tratamientos, usando Excel 2016.

## Resultados

En el primer tratamiento realizado en el biorreactor TEC – FERM de 5 L (Figura 1), se utilizó una concentración de 0.299 mg/L de acetato de sodio en el medio RM,

bajo las condiciones de trabajo previamente establecidas, obteniéndose un recuento de inicial de  $1,0 \times 10^4$  Cel/mL y un recuento final del  $1 \times 10^3$  Cel/mL durante los 34 días del estudio. El pH presentó fluctuaciones entre 6,7 a 7,5, cercano a la neutralidad.

**Figura 1.** Biorreactor TEC-FERM.



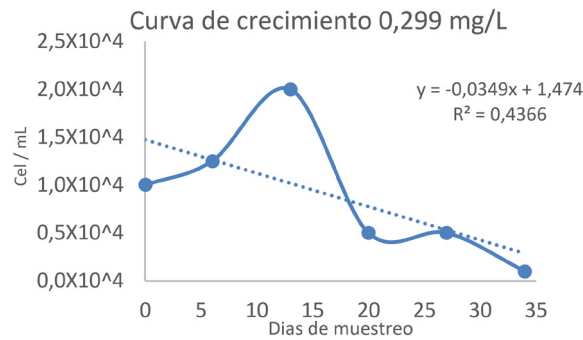
**Fuente:** García Martin Laura (5).

El recuento celular obtenido con el tratamiento de 0,299 mg/L de acetato de sodio indica que la microalga presenta crecimiento exponencial hasta el día 13 con un recuento celular de  $2,0 \times 10^4$  Cel/mL hasta el día 20, cuando empieza a disminuir el recuento celular hasta el día 34 con un recuento celular de  $1 \times 10^3$  Cel/mL (Figura 2).

Las tendencias de crecimiento fueron ajustadas al modelo logístico mediante transfor-

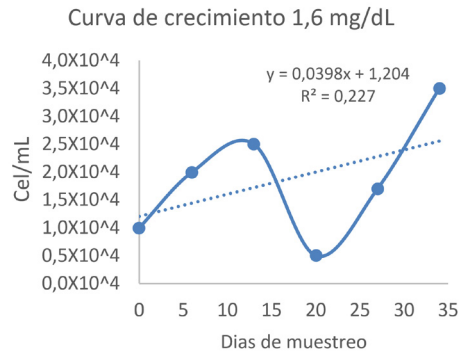
mación de los valores de Y a los que se les calculó su logaritmo en base 10 para obtener log vs t del crecimiento celular. La idea de realizar el ajuste fue ajustar los datos y determinar si existían diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de los tratamientos ensayados.

**Figura 2.** Curva crecimiento celular con 0,299 mg/L de acetato de sodio.



**Fuente:** García Martin Laura (5).

**Figura 3.** Curva crecimiento celular con 1,6 mg/L de acetato de sodio.



**Fuente:** García Martin Laura (5).

En el recuento celular obtenido con el tratamiento de 1,6 mg/L de acetato de sodio se observó de nuevo que la microalga presenta un crecimiento exponencial hasta el día 13, donde alcanzó un recuento de  $2,5 \times 10^4$  Cel/mL y comienza a disminuir hasta el día 20, el día 27 presenta un recuento de  $1,7 \times 10^4$  Cel/mL. En el día 34 se obtiene un au-

mento del recuento celular de  $3,5 \times 10^4$  Cel/mL, valor superior al del día 13, día en el que finaliza la fase exponencial de la microalga (Figura 3). El medio de cultivo con mayor velocidad específica de crecimiento fue el RM con concentración de acetato 0,299 mg/L con una velocidad de crecimiento de 0.029 Células/día (Tabla 2).

**Tabla 2.** Velocidad de crecimiento de los montajes analizados.

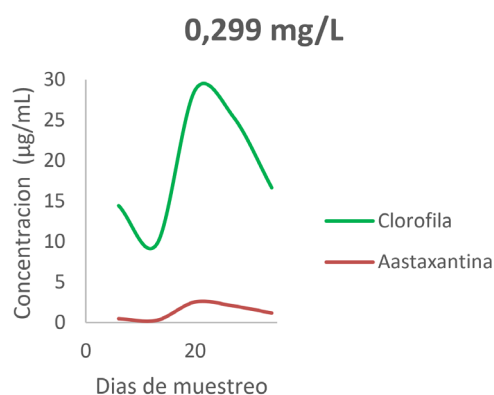
Medio de cultivo	Numero de datos	Dato mínimo	Dato máximo	Velocidad de crecimiento	Coefficiente de determinación
RM y acetato 0,299 mg/L	6	4.204	4,300	0,029 Cel/día	79%
RM y acetato 1,6 mg/L	6	4.301	4,540	0,014 Cel/día	49%

**Fuente:** García Martin Laura (5).

Al realizar el ANOVA (95%), se estableció que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ensayados ( $P=0,795$ ;  $gl=1$ ;  $F=0,071$ ), lo cual indica que el tratamiento que brinda mejores resultados es aquel donde se utilizó 0,299 mg/L de acetato de sodio, ya que con esta concentración se obtuvo un mayor crecimiento y la mejor velocidad de crecimiento mejorando el crecimiento de la microalga que posiblemente produzca una mayor acumulación de astaxantina.

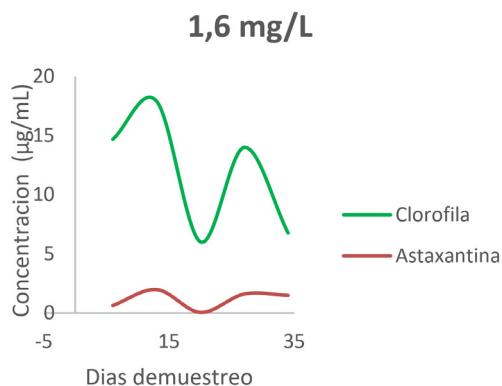
En cuanto a las concentraciones de astaxantina y clorofila expresadas en  $\mu\text{g/mL}$ , en el tratamiento con 0,299 mg/L de acetato de sodio (Figura 4), se pudo establecer que se encuentra mayor concentración de clorofila que de astaxantina ambas presentando su pico máximo en el día 20, en donde presentan concentraciones de 28,706  $\mu\text{g/mL}$  de clorofila y 2,530  $\mu\text{g/mL}$  de astaxantina, comportamiento que se correlaciona con el recuento celular y absorbancias obtenidas.

**Figura 4.** Concentraciones de clorofila y astaxantina durante el montaje de 0,299 mg/L.



**Fuente:** García Martin Laura (5).

**Figura 5.** Concentraciones de clorofila y astaxantina durante el montaje de 1,6 mg/L.



**Fuente:** García Martin Laura (5).



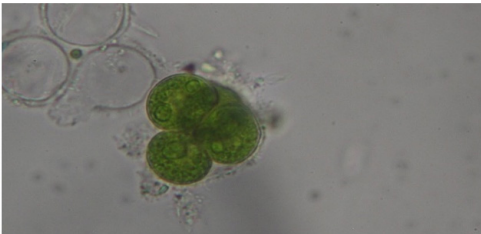
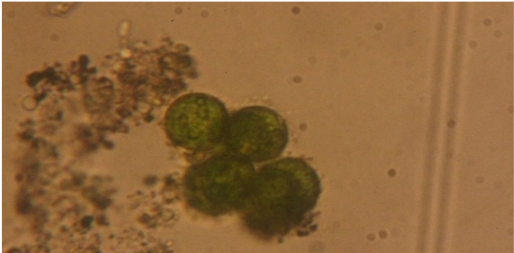
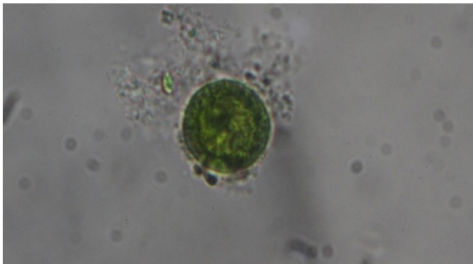

En cuanto a las concentraciones de astaxantina y clorofila expresadas en  $\mu\text{g/mL}$ , en el tratamiento con 1,6 mg/L de acetato de sodio (Figura 5), se encontró mayor concentración de clorofila que de astaxantina ambas presentando su pico máximo en el día 13, en donde presentan concentraciones de 17,902  $\mu\text{g/mL}$  de clorofila y 1,991  $\mu\text{g/mL}$  de astaxantina, comportamiento que se correlaciona con el recuento celular y absorbancias obtenidas.

Al realizar el ANOVA (95%), se estableció que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ensayados para la con-

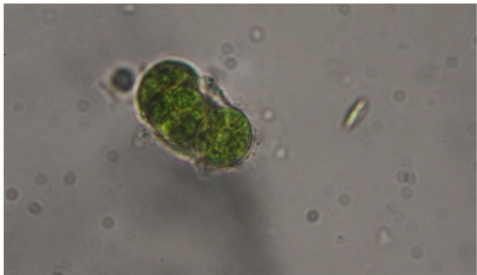

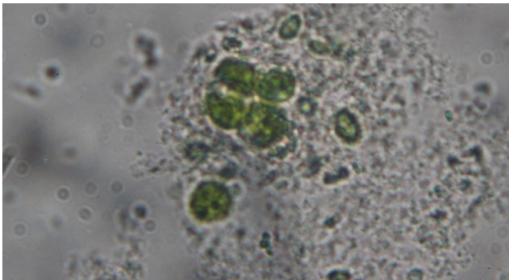
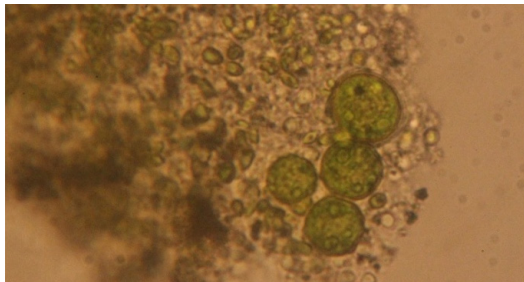
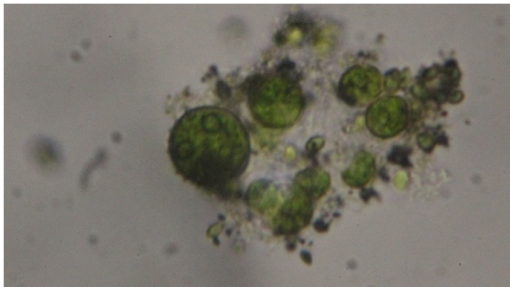
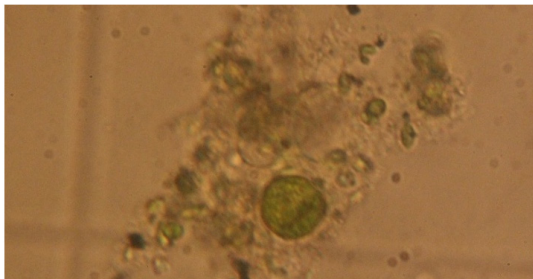
centración de clorofila ( $P=1$ ;  $gl=1$ ;  $F=0$ ) y astaxantina ( $P=0,820$ ;  $gl=1$ ;  $F=0,054$ ), lo que significa que en relación a concentración de astaxantina no existe diferencias en usar la concentración de 0,299 mg/L o usar la concentración de 1,6 mg/L de acetato de sodio, pues los dos van a presentar una concentración similar estadísticamente.

Durante cada montaje se llevó un registro fotográfico microscópico con el fin de evaluar la morfología de la microalga desde sus formas vegetativas hasta sus formas enquistadas (Tabla 3).

**Tabla 2.** Velocidad de crecimiento de los montajes analizados.

DÍA	0,299 mg/L	1,6 mg/L
	IMAGEN	IMAGEN
6		
13		



DÍA	0,299 mg/L	1,6 mg/L
	IMAGEN	IMAGEN
20		
27		
34		

**Fuente:** Elaboración propia.

En cuanto al registro fotográfico de los dos tratamientos 0,299 mg/L y 1,6 mg/L de acetato de sodio, no existe alguna diferencia morfológica pues los dos presentaron formas celulares vegetativas, biflagelas y palmeloides sin acumulación de astaxantina, esto gracias a que, aunque si se hallaron concentraciones de astaxantina, al momento de realizar el registro fotográfico no se pudieron observar formas quísticas con acumulación de astaxantina.

Entre los días 13 y 20 fue en donde se observaron mayor cantidad de formas celulares vegetativas verdes sin flagelos, debido a que el crecimiento exponencial de *H. pluvialis* ha terminado e inicia su fase de deceso, mientras que en los días finales de los tratamientos se observaron formas celulares quísticas debido a que se iban agotando los nutrientes y estas formas son más resistentes (Tabla 4) (1,2).

**Tabla 4.** Comparativo entre el tratamiento de 0,299 mg/L y 1,6 mg/L de acetato sodio.

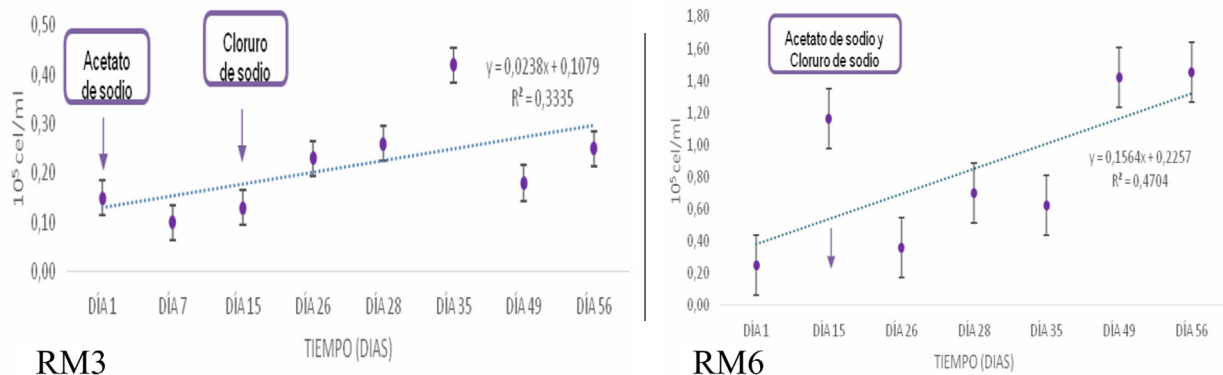
[ ] ACETATO DE SODIO	RECuento CELULAR Cel/mL	PH	[ ] DE ASTAXANTINA µg/mL	[ ] DE CLOROFILA µg/mL	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Cel/día
0,299 mg/L	2,0 x10 <sup>4</sup>	7,5	2,530	28,706	0,029
	Día 20	Día 34	Día 20	Día 20	
1,6 mg/L	3,5 x10 <sup>4</sup>	8,6	1,991	17,902	0,014
	Día 34	Día 34	Día 13	Día 13	

**Fuente:** Elaboración propia.

El tratamiento con 0.320 g/L de acetato de sodio y 1.28 g/L de cloruro de sodio, adicionados desde el día 15 del estudio al medio RM (RM6), iluminación con lámparas blancas con 20h luz/4h oscuridad y 70 µE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> de irradianza tuvo una velocidad de crecimiento de 1,018 cel/día, seguido por el

tratamiento RM3, el cual contenía acetato de sodio 1,6 g/L que se agregó desde el inicio y cloruro de sodio 6,4 g/L que se adicionó el día 15 del estudio, usando la misma irradianza y fotoperiodo con una velocidad de crecimiento de 0,696 cél/día (Figura 6).

**Figura 6.** Curva de crecimiento T. RM3 Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L y T.RM6 Acetato de sodio 0,320 g/L + Cloruro de sodio 1,28 g/L.

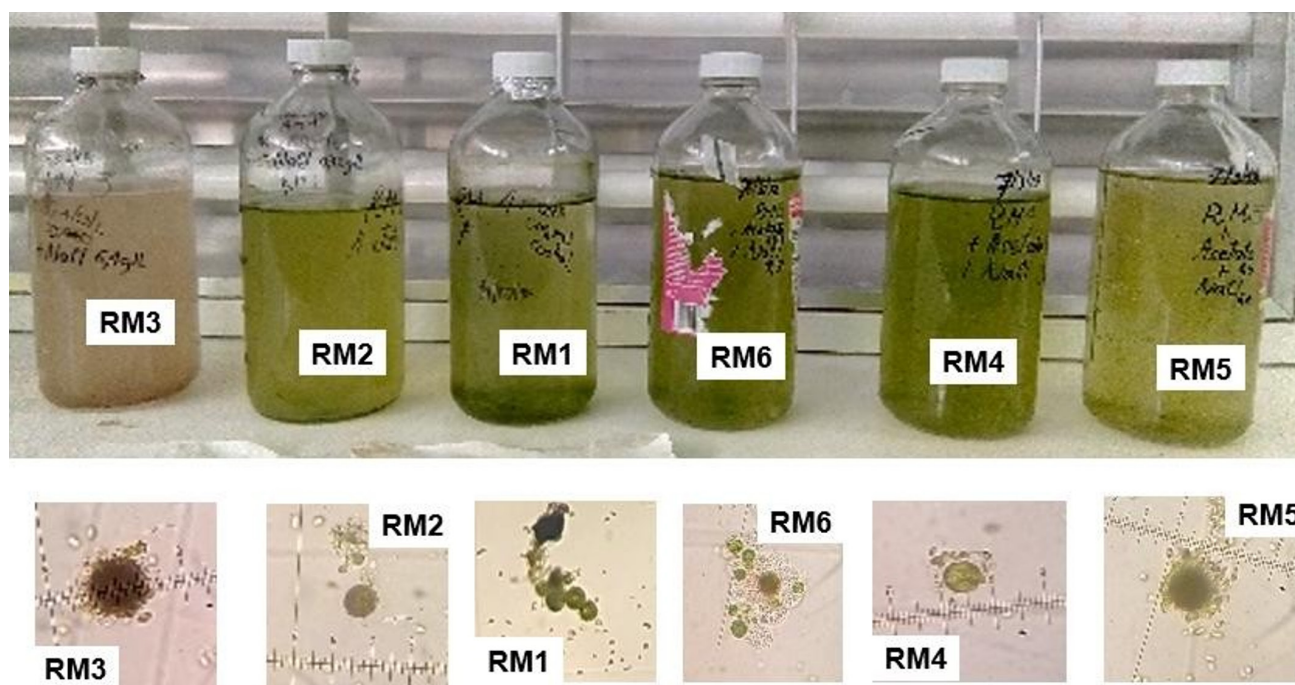


**Fuente:** Rodríguez, R. L. J. (30).

El análisis de varianza ANOVA (95%) estableció con respecto al crecimiento celular que existen diferencias significativas ( $F=22,47$ ;  $p=0,025$ ;  $gl=5$ ) entre estos diferentes tratamientos. El tratamiento RM6 y RM4 fueron los que presentaron mayor crecimiento,  $1,45 \times 10^5$  cel./ml y  $1,25 \times 10^5$  cel./ml, respectivamente. El control (RM1) tuvo un crecimiento de  $2,69 \times 10^5$  cel./ml (Figura 6).

En el estudio se observaron las dos fases por las que atraviesa la microalga *H. pluvialis*: fase vegetativa y fase roja debido a la combinación de factores de estrés. Se observan formas de palmella y células enquistadas (RM3) y aplanosporas (Figura 7).

**Figura 7.** Cultivo *H. pluvialis* T. RM1, RM2, RM3, RM4, RM5 y RM6 Día 35.



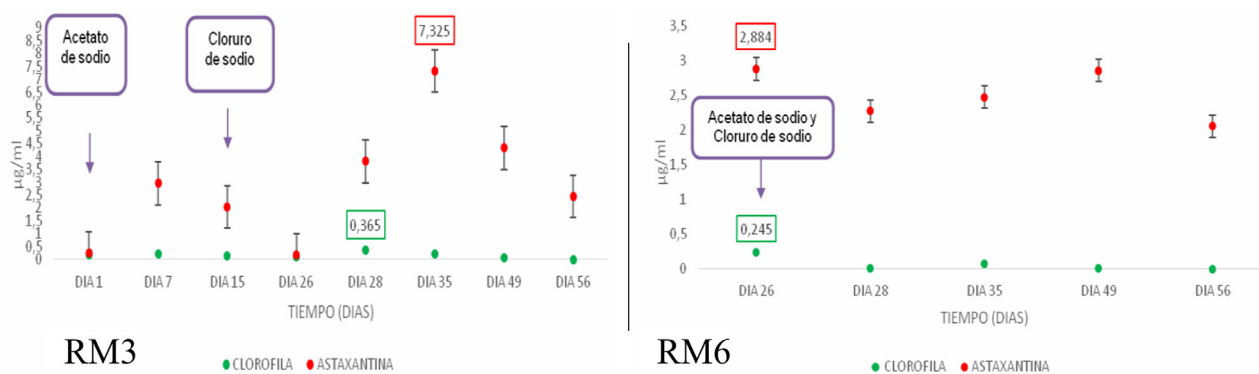
**Fuente:** Rodríguez, R. L. J. (30).

El tratamiento que presentó una mayor concentración de clorofila fue el RM6 obteniendo 0,245 microgramos/L, presentándose diferencias significativas entre tratamientos

( $F=4,307$ ;  $p=0,003$ ;  $gl=5$ ). La producción de clorofila se correlaciona con el crecimiento de la microalga porque al aumentar la biomasa incrementa el contenido de clorofila.

**Figura 8.** Concentración de clorofila (color verde) y astaxantina (color rojo) T. RM3

Acetato de sodio 1,6 g/L + Cloruro de sodio 6,4 g/L y T.RM6 Acetato de sodio 0,320 g/L + Cloruro de sodio 1,28 g/L



**Fuente:** Rodríguez, R. L. J. (30).

El tratamiento RM3 presentó la mayor concentración de astaxantina de 7,325 microgramos/ml, utilizando una concentración de acetato de sodio 1,6 g/L desde el inicio del estudio y cloruro de sodio de 6,4 g/L que se agregó el día 15 del estudio (Figura 3). Al analizar los tratamientos realizados respecto a la astaxantina no hubo diferencias significativas ( $F=1,687$ ;  $p=0,165$ ;  $gl=5$ ).

## Discusión

A modo de suplir la necesidad de obtención de astaxantina a gran escala, se utilizó el biorreactor TEC-FERM de 5 L. El uso de biorreactores, para el escalamiento, con sistemas cerrados como el utilizado en este estudio, proporcionan mejores opciones para el crecimiento de la mayoría de microalgas, pues estos protegen el cultivo de la contaminación por microorganismos no deseados y de esta forma se permite que se tenga un control integral de las condiciones de cultivo (3, 4). Además de esto, tomando como base los resultados (4) y el trabajo (5), se tomó la decisión de utilizar el medio RM bajo las condiciones de estrés como lo son las diferentes concentraciones de acetato de sodio (0,299 mg/L Y 1,6 mg/L), pH 6,8, temperatura  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperiodo 20h luz blanca y 4h oscuridad, aire filtrado, agitación fluctuante entre 90 y 180 rpm, todo con el fin de aumentar el crecimiento del inoculo inicial  $1,0 \times 10^4$  Cel/mL y así inducir en la microalga la acumulación de astaxantina en su forma quística, con lo cual se pueda corroborar lo dicho por (6).

Del mismo modo muchos autores se han dedicado a investigar cuáles son los factores de estrés que ayudan a la adecuada acumulación de astaxantina, como el tipo, color y nivel de intensidad de luz, la agitación, el pH los cuales han arrojado buenos resultados como en (7), en donde se realizó cultivo en un fotobiorreactor tipo Airlift, manejando elevadas concentraciones de salinidad y alta intensidad de luz, como condiciones de trabajo y obtuvo una acumulación de astaxantina de 32,99  $\mu\text{g/mL}$  (8), es por esto que en este estudio se utiliza el acetato de sodio como factor de estrés en diferentes concentraciones.

Existe la inquietud por investigar nuevos factores de estrés para *H. pluvialis*, como variar las concentraciones de acetato de sodio ya que este ayuda a promover el crecimiento celular (6,4,9), otras investigaciones afirman que la concentración de acetato de sodio se debe controlar ya que con niveles inapropiados se puede generar la inhibición del crecimiento celular (9). En este estudio se trabajó con concentraciones de acetato de sodio 0.299 mg/L y 1.6 mg/L a diferencia de Niño, et al (10) que sometió a *H. pluavilis*, en el medio RM, a 0.310 mg/L de acetato de sodio obteniéndose un crecimiento celular de  $7.55 \times 10^5$  Cel/mL y una velocidad de crecimiento de 0,092 Cel/día en 36 días, siendo el RM el que presentó mejor rendimiento en cuanto a crecimiento celular y obtención de astaxantina en comparación con los otros medios ensayados OHM, BBM (10).



En el tratamiento con 0,299 mg/L de acetato de sodio, crecimiento de  $2,0 \times 10^4$  Cel/mL y velocidad de crecimiento de 0,029 Cel/día se obtuvo mejor tasa de crecimiento, lo que ayuda a la mayor acumulación de astaxantina, esto siendo muy consecuente con lo mencionado en Park et al (11), que realiza sus tratamientos con un fotobiorreactor tipo APBR y en sistema batch con las mismas condiciones de trabajo de este estudio y obtiene mejores resultados en el cultivo, tal vez debido a que en él se puede mantener un mayor control de las condiciones de trabajo (11), a diferencia del biorreactor TEC-FERM de 5 L utilizado en esta investigación.

Por otra parte, se puede decir que con las concentraciones de acetato de sodio (0,299 mg/L y 1,6 mg/L) se obtiene mejor tasa de crecimiento, con recuentos de  $2,0 \times 10^4$  Cel/mL y  $3,5 \times 10^4$  Cel/mL respectivamente, mientras que González et al (12), solo pudo obtener un aumento de  $1,0 \times 10^4$  a  $1,8 \times 10^4$  cel/ml, lo que nos lleva a validar su postulado de que la suplementación de medios con acetato de sodio ayuda al incremento del crecimiento celular y a la formación de formas celulares quísticas (12, 13).

Del mismo modo aunque se obtuvo mayor recuento celular que algunos otros estudios en los cuales se realizó suplementación con acetato de sodio (14,9), se observa que los recuentos celulares que se obtuvieron entre los días 15 y 20 del estudio para los dos tratamientos estuvieron en un rango de  $2,0 \times 10^4$  Cel/mL y  $5 \times 10^3$  Cel/mL para el tra-

tamiento con 0,299 mg/L y para el tratamiento con 1,6 mg/L se obtuvo un rango de crecimiento de  $2,5 \times 10^4$  Cel/mL y  $5 \times 10^3$  Cel/mL, esto se puede explicar de dos formas diferentes.

En la primera se puede decir que el microorganismo simplemente siguió su ciclo natural de crecimiento de aproximadamente 15 días (1,2,13) como lo describe la literatura, o la segunda mencionada por (15) en donde afirma que la concentración de acetato deberá ser controlada a niveles apropiados con el fin de evitar la inhibición del crecimiento celular por acción del acetato de sodio, debido a que en su investigación con altas concentraciones de acetato de sodio 50 Mm, obtuvo un rápido cambio morfológico de células vegetativa a forma quística y realizaba el blanqueamiento total de las células quísticas (9), lo que nos lleva a cuestionarnos si la adecuada concentración de acetato de sodio es de 0,310 mg/L (4).

Un factor a resaltar es que la mayoría de los estudios suplementados con acetato de sodio tienden a tener una mayor producción de biomasa que de astaxantina como lo observado en el presente estudio y es que así como se puede hacer referencia a los autores que han descrito anteriormente que las células de *H. pluvialis* solo requiere carbono como principal nutriente en la “etapa de crecimiento” y este puede ser suministrado diariamente por inyección de  $\text{CO}_2$  o por aire filtrado como en el presente estudio y con alta irradiación, fotoperiodos 20h luz y 4 oscuridad, se proporciona mayor energía

para la fijación fotosintética del carbono, lo que conduce a que haya una mayor tasa de síntesis de astaxantina (3); lo que lleva a deducir que en el estudio posiblemente no hubo la adecuada fijación fotosintética debido a que el biorreactor TEC-FERM presenta una especie de ventana pequeña para su tamaño por donde entra la luz, lo que posiblemente, fue un factor determinante que evitó que se diera una elevada tasa de síntesis de astaxantina pero si una adecuada producción de biomasa.

Actualmente compañías dedicadas a la producción comercial de astaxantina a partir de microalgas (Cyanotech y Aquasearch), recurren a un sistema compuesto por dos etapas, la primera o también llamada “etapa verde” que consiste en producir biomasa verde en condiciones óptimas de crecimiento y la segunda o también llamada “etapa roja” que se inicia cuando la microalga es expuesta a condiciones ambientales adversas para inducir a la acumulación de astaxantina (3). Es aquí donde la suplementación con acetato de sodio puede ser implementada desde el día 15, debido a que va a presentar un rendimiento adecuado en cuanto a la producción de biomasa y ayuda a la formación de quistes, los cuales son la forma celular adecuada para acumulación de astaxantina.

En cuanto a la concentración de astaxantina ( $\mu\text{g/mL}$ ) en el estudio se obtuvo, para el tratamiento con 0,299 mg/L de acetato de sodio, la mayor concentración de astaxantina en el día 20 con 2,530  $\mu\text{g/mL}$  y para el día 34 fue de 1,161  $\mu\text{g/mL}$ ; mientras que el

tratamiento con 1,6 mg/L obtuvo una elevada concentración de astaxantina en el día 13 con 1,991  $\mu\text{g/mL}$  y para el día 34 fue de 1,5  $\mu\text{g/mL}$ , resultados que pueden ser correlacionados perfectamente con el recuento celular obtenido para esos días. Por otro lado, en cuanto a la concentración de clorofila se puede decir que sucedió algo muy similar, ya que en el tratamiento de 0,299 mg/L en el día donde se halló mayor concentración fue en el día 20 con 28,706  $\mu\text{g/mL}$  y en el día 34 fue de 16,637  $\mu\text{g/mL}$ ; mientras que para el tratamiento con 1,6 mg/L se halló una mayor concentración en el día 13 con 17,402  $\mu\text{g/mL}$  y para el día 34 fue de 6,752  $\mu\text{g/mL}$ .

Aunque la concentración de clorofila fue disminuyendo a medida que se acercaba el final del estudio, la astaxantina iba aumentando su concentración, lo cual era lo realmente importante del proyecto, pero se observó que durante todo el estudio en los dos tratamientos realizados la clorofila y astaxantina fueron inversamente proporcionales, lo que coincide con lo descrito por todos los autores consultados (16, 17,3). Es aquí donde se reafirma la situación planteada anteriormente en donde el estudio puede ser llevado en “etapa verde” hasta el día 20, ya que en este día se obtiene una buena producción de biomasa y después de este día se puede suministrar inyecciones directas de  $\text{CO}_2$ , acetato de sodio y alta irradianza con fotoperiodos de 20h luz y 4h oscuridad, con el fin de generar el estrés indicado para la iniciación de la “etapa roja”, y así las células inicien el verdadero estrés y de esta



forma comience la acumulación de astaxantina y por lo tanto una buena obtención de la misma a futuro.

Las inyecciones de  $\text{CO}_2$  también pueden ser sustentadas gracias a que este ayuda a regular el pH, lo que es un claro ejemplo de lo observado en el tratamiento con 1,6mg/L de acetato de sodio, donde el aumento de pH inclinado hacia la alcalinidad, fue una posible causa de que la velocidad de crecimiento celular fuera menor, en comparación al tratamiento con 0,299 mg/L, que presentó un pH más neutral y una mejor velocidad de crecimiento celular, razón por la cual se sugiere que la inyección directa de  $\text{CO}_2$  se sume a las condiciones de trabajo para los estudios de escalamiento de *H. pluvialis*.

Todos los resultados obtenidos hasta el día 20 se deben a la etapa de crecimiento o “etapa verde”, generalmente dura de 9 a 20 días según la relación entre la biomasa celular y la actividad celular, lo cual se pudo evidenciar en el estudio debido a que en este tiempo fue en donde se obtuvo un mayor crecimiento celular. Luego llegando a la etapa de acumulación de astaxantina o “etapa roja”, la morfología de aplanospora cambia por la disminución de nutrientes, de esta manera se deduce que para que el estudio presente mejores resultados, el estrés con el acetato de sodio puede ensayarse aplicándolo a partir del día 15 o 20 y no desde el primer día, ya que los estudios que han tenido mejores rendimientos han aplicado el estímulo desde el día 15 sin importar su fuente de carbono (17).

El en trabajo en el cual se utilizaron 5 tratamientos y un control (RM1), se estableció en las curvas de crecimiento de la microalga *H. pluvialis*, que la fase exponencial se presentó en diferentes días del estudio.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Niño et al (10), que obtuvieron una concentración celular máxima de  $7,55 \times 10^5$  células/ml en medio RM en comparación con otros medios como OHM y BBM y de (18) con una concentración celular máxima de  $9,50 \times 10^5$  células/ml en medio RM; se seleccionó, el medio RM ya que es bien sabido que el medio de cultivo no solo afecta la productividad celular, sino también afecta la composición celular y el rendimiento de productos específicos. Utilizando este medio en nuestro estudio encontramos una concentración celular máxima de  $2,69 \times 10^5$  células/ml en medio RM1, siendo este el control. Estos resultados sugieren que el medio que provee los nutrientes adecuados para el crecimiento de *H. pluvialis* es el medio RM, similares resultados los obtuvo (19).

En el estudio donde utilizamos 5 tratamientos, se observó que el mayor conteo celular aparte del control, fue de  $1,45 \times 10^6$  células/ml en el tratamiento RM6 al cual se le adicionó 0,320 mg/L de acetato de sodio y 1,28 mg/L de cloruro de sodio en el día 31 del estudio, concluyendo que estas concentraciones de sales no logran el suficiente estrés para inhibir el crecimiento celular.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor (concentración celular) para

los cinco tratamientos y el control encontrando diferencias significativas entre los tratamientos evaluados con una confianza del 95%.

Es de aclarar que según el estudio de (20) donde se utilizó acetato de sodio (1 g/l) para comparar si se debía añadir este compuesto junto con los nutrientes orgánicos al comienzo del cultivo como en la mixotrofia tradicional (TM), o al final de la fase logarítmica en modo fotótrofo como mixotrofia alternativa (AM), el estudio concluyó que el peso seco (DW), los pigmentos y especialmente el número de células en la mixotrofia alternativa (AM) fueron más altos que la mixotrofia (TM) tradicional (21).

El número de células en AM casi se duplicó de  $21.7$  a  $42.9 \times 10^4$  células mL durante 5 días de exposición a acetato de sodio, mientras que el aumento fue solo 1.2 veces en TM. Eso quiere decir que en próximos estudios podría ser más eficiente agregar el acetato de sodio de una forma mixotrófica alternativa o sea al final de la fase exponencial, ya que así se puede minimizar el riesgo de contaminación debido a la menor exposición de las células a las fuentes de carbono orgánico, sobre todo si el objetivo es obtener el máximo recuento posible de la microalga, sin embargo hay que tener en cuenta la concentración de acetato de sodio adicionado porque en el tratamiento donde se usó acetato de sodio de 1,6 mg/L desde el principio en el biorreactor TEC-FERM de 5 litros y la adición a los 15 días de cloruro de sodio mejoró la producción de astaxan-

tina porque el acetato de sodio fue utilizado como fuente de carbono y generó mayor producción de biomasa que luego fue estresada con la combinación de cloruro de sodio y luz blanca alta con fotoperiodo de 20 h luz:4h oscuridad e irradianza de 70  $\mu$ E, por el contrario en el tratamiento donde se utilizó combinados el estrés con acetato de sodio, cloruro de sodio y luz alta con el fotoperiodo mencionado, no se logró una buena biomasa ni una buena producción de astaxantina con una disminución del 71% en su contenido. Observándose el impacto de la concentración de acetato de sodio de 1,6 mg/L sobre el crecimiento celular del *H. pluvialis*.

En los medios de cultivo macroscópicamente se observa un cambio de color rojizo en el medio RM3 desde el día 1 y medios RM2, RM5 y RM6 en el día 24 del estudio (Figura 7), que son congruentes con la observación microscópica realizada para analizar la evolución de la morfología de la microalga mediante su proceso de producción de astaxantina, observándose los cambios en morfología desde las formas vegetativas verdes hasta las aplanosporas y enquistadas con color rojo. Siendo estos resultados congruentes con el estudio de Su et al (22) donde al estresar la microalga con una alta intensidad de luz y acetato de sodio lograron evidenciar que a los dos días las células se volvían ligeramente rojizas indicando la transición a aplanospora (22).

Respecto a los resultados obtenidos de producción de astaxantina se logra evidenciar

un aumento en el contenido de este pigmento, simultaneo con una disminución de la concentración de clorofila, congruente con los resultados obtenidos en (23) donde en su experimento después de 9 días de estrés, el contenido total de clorofila en todos los tratamientos fue un 90% menor que el de las células móviles verdes al inicio (23).

En el estudio de Wayama et al (24), se realizó una evaluación volumétrica, el resultado de estas imágenes 3D logró evidenciar que existían cambios drásticos en la transición entre la etapa verde y la etapa roja. En la etapa verde, los cloroplastos representaron el 41.7% del volumen total de células, mientras que el volumen total de astaxantina fue de 0.2% donde se observaron los cloroplastos altamente desarrollados en la periferia y pocos gránulos de astaxantina rodeando el núcleo. En la etapa roja, las gotas de aceite que contenían astaxantina predominaron con un 52% y el volumen total de cloroplastos disminuyó a 9.7% observándose gotas de aceite grandes en toda la célula, los cloroplastos estaban altamente degenerados y localizados en el espacio intermedio entre las gotas de aceite, que les daba una apariencia de red. Es importante aclarar que los cloroplastos no desaparecieron completamente, esto puede deberse a que serán utilizados en una recuperación rápida cuando las condiciones ambientales se reestablezcan y la descomposición de clorofila ha sido inducida por la deficiencia de nutrientes (24), lo cual también se observó en esta investigación.

Según los resultados obtenidos el medio RM3 al cual se le adicionó 1,6 mg/L de acetato de sodio desde el inicio del cultivo en el biorreactor TEC-FERM de 5 L. y la adición de 6,4 mg/L de cloruro de sodio el día 15 del cultivo presentó la mayor producción de astaxantina con una concentración de 7,3 microgramos/L, que es congruente con los resultados obtenidos por Domínguez et al (25) que utilizó 1g/L de acetato de sodio junto a iluminación continua y obtuvo una producción máxima de astaxantina de 98 mg/g de biomasa y también con los resultados de Cifuentes et al (6) donde quiso descubrir condiciones óptimas para la producción de biomasa y astaxantina al someter la microalga a condiciones mixotróficas, es decir acetato de sodio con concentraciones de 4,8,12 mM bajo alta irradianza de luz y el cloruro de sodio al 0,8%. Se obtuvo un contenido de astaxantina por peso seco de 10, 3 mg g<sup>-1</sup> (1% p / p) y también se ha observado que la adición simultánea de acetato de sodio / NaCl en una concentración de 4.4 mM /17.1 mM aumenta la producción de astaxantina (6).

Según el análisis de expresión de genes relacionados con la producción de carotenoides durante la inducción de estrés realizado por Vidhyavathi et al (26) nos dice que la adición de acetato de sodio y cloruro de sodio producen una transcripción temprana y regulación máxima positiva de genes como BKT ( $\beta$ -caroteno cetolasa) que se encarga de la transformación de zeaxantina a adonixantina y adonixantina a astaxantina, desde tres días de estrés hasta tres meses

después (26). Esto explicaría los resultados obtenidos en el estudio donde se observa una mayor producción de astaxantina al someter la microalga a estrés salino, ya que como se mencionó previamente la combinación de estos dos factores de estrés con la alta irradiación con luz blanca y fotoperiodo de 20h luz:6h oscuridad, aumenta su producción, ya que estos carotenoides se acumulan en estructuras especiales tales como plastoglóbulos de plástidos o cuerpos lipídicos citoplasmáticos, jugando roles en prevenir el exceso de la energía lumínica del alcance de la maquinaria fotosintética (27-29).

## Conclusiones

Los biorreactores de sistemas cerrados como el utilizado en este estudio, el biorreactor Tecferm de 5 Litros, proporcionan condiciones adecuadas para el crecimiento de la microalga *H. pluvialis*, ya que protegen el cultivo de la contaminación por microorganismos no deseados y de esta forma se permite que se tenga un control integral de las condiciones de cultivo, las cuales fueron establecidas según la revisión teórica realizada. El biorreactor se utilizó para producir biomasa de la microalga en la calidad y cantidad adecuadas conservando su morfología y también se produjo el colorante astaxantina.

El crecimiento de la microalga en el biorreactor con el tratamiento con 0,299 mg/L de acetato de sodio y las demás condiciones

establecidas para el proceso fue de  $2,0 \times 10^4$  Cel/mL con una velocidad de crecimiento de 0,029 Cel/día, mientras que el tratamiento con 1,6 mg/L de acetato de sodio obtuvo un crecimiento celular de  $3,5 \times 10^4$  Cel/mL con una velocidad de crecimiento de 0,014 Cel/día, resultados obtenidos en los 34 días del estudio, lo que nos indica que el tratamiento con 0,299 mg/L de acetato de sodio presentó una velocidad de crecimiento 2 veces mayor al tratamiento con 1,6 mg/L. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos ( $P > 0.05$ ).

En el tratamiento RM3, medio RM con una concentración de acetato de sodio de 1,6 mg/L y al cual se adicionó a los 15 días del cultivo cloruro de sodio en una concentración de 6,4 mg/L se produjo la mayor cantidad de astaxantina de 7,325 µg/ml a los 29 días de tratamiento, correlacionado con las características macroscópicas y microscópicas obtenidas para este tratamiento. Esta investigación destaca por lo tanto la importancia de cultivar inicialmente la microalga utilizando el biorreactor Tecferm de 5 litros y después de su fase exponencial someterla a factores de estrés.

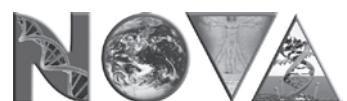
## Referencias

1. Jeon YC, Cho CW, Yun YS. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006 Jul 3; 39(3):490-5.
2. Wang N, Guan B, Kong Q, Sun H, Geng Z, Duan L. Enhancement of astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* mutants by three-stage

- mutagenesis breeding. Journal of biotechnology. 2016 Oct 20; 236:71-7.
3. Wang, Junfeng, et al. Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* in an outdoor photobioreactor. Journal of applied phycology 2013. 25.1: 253-260.
  4. Giannelli, Luca, et al. Effects of temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. Journal of bioscience and bioengineering 2015.119.3: 345-350.
  5. García Martín Laura. Producción biotecnológica de astaxantina a partir *Haematococcus pluvialis*. 2018. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 86p.
  6. Cifuentes A, González M, Vargas S, Hoeneisen M, González N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions Biol Res. 2003. 36: 343-357.
  7. Ramírez D. Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. 2013. [Citado 2019 Febrero 25]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/11205/1/300061.2013.pdf>
  8. Tocquin P, Fratamico A, Franck F. Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth. Journal of applied phycology. 2012 Jun 1; 24(3):365-73.
  9. Wan, Minxi, et al. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light–dark cyclic cultivation. Bioresource technology 2014. 167: 276-283.
  10. Niño-Castillo CM, Rodríguez-Rivera FC, Díaz LE, Lancheros-Díaz AG. Evaluation of Cell Growth Conditions for the Astaxanthin Production as of *Haematococcus pluvialis* Microalgae. Nova. 2017 Dec; 15(28):19-31.
  11. Park, J. C., Choi, S. P., Hong, M. E., & Sim, S. J. Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. Bioprocess and biosystems engineering. 2014; 37(10), 2039-2047.
  12. González MA, Cifuentes AS, Gómez PI. Growth and total carotenoid content in four Chilean strains of *Haematococcus pluvialis* Flotow, under laboratory conditions. Gayana. Botanica 2009. 66(1), 58.
  13. Ranga R, Sarada A, Baskaran V, Ravishankar G. Identification of Carotenoids from Green Alga *Haematococcus pluvialis* by HPLC and LC-MS (APCI) and Their Antioxidant Properties. J. Microbiol. Biotechnol. 2009. 19:1333–1341
  14. Shakhmatov AS, Pavlovskiy EV, Paukov AG. Desmid algae (Charophyta: Conjugatophyceae) of Ekaterinburg, Middle Urals, Russia. Folia Cryptogamica Estonica. 2018 May 29; 55:7-15.
  15. Woong C, Jeon Y, Sang Y. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. Rev Enzyme and Microbial Technology. Corea del Sur. 2006 Julio. [accessed Mar 01 2018]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/228353480\\_Combined\\_effects\\_of\\_light\\_intensity\\_and\\_acetate\\_concentration\\_on\\_the\\_growth\\_of\\_unicellular\\_microalga\\_Haematococcus\\_pluvialis](https://www.researchgate.net/publication/228353480_Combined_effects_of_light_intensity_and_acetate_concentration_on_the_growth_of_unicellular_microalga_Haematococcus_pluvialis).
  16. Infant Santhos B, Elumalai S, Rajesh Kanna G. Airlift photobioreactor cultivation of a new strain of *Haematococcus pluvialis* collected from high altitude regions of Himalayas. International Journal of Science and Research. 2014; 3(10):2289-92.
  17. Camacho Kurmen, J. E., González, G., & Klotz, B. Astaxanthin Production in *Haematococcus pluvialis* under different stress conditions. Nova, 2013. 11(19), 94-104.
  18. Imamoglu E, Sukan FV. Effect of Different Culture Media and Light Intensities on Growth of *Haematococcus pluvialis*. International journal of natural and engineering sciences. 2007; 1(3):5–9 doi: 10.1007/s11738-002-0058-9

19. Leiton Arcos Y. A. Producción de *Haematococcus pluvialis* en el biorreactor Tecferm de 5 L en medios de cultivo RM y BBM. 2018. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 91 p.
20. Goksan T, Ak I, Gokpinar S. An alternative approach to the traditional mixotrophic cultures of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). *Journal of microbiology and biotechnology*. 2010 Sep; 20(9):1276-82.
21. Infant Santhos B, Elumalai S, Rajesh Kanna G. Airlift photobioreactor cultivation of a new strain of *Haematococcus pluvialis* collected from high altitude regions of Himalayas. *International Journal of Science and Research*. 2014. 3(10):2289-92.
22. Su Y, Wang J, Shi M, Niu X, Yu X, Gao L, Zhang X, Chen L, Zhang W. Metabolomic and network analysis of astaxanthin-producing *Haematococcus pluvialis* under various stress conditions. *Biore-source technology*. 2014 Oct 1; 170:522-9.
23. Vidhyavathi R, Venkatachalam L. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of Experimental Botany*. 2008. 59:1409-1418
24. Wayama M, Ota S, Matsuura H, Nango N, Hirata A, Kawano S. Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *PloS one*. 2013 Jan 11; 8(1):e53618.
25. Domínguez-Bocanegra AR, Legarreta IG, Jeronimo FM, Campocosio AT. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource technology*. 2004 Apr 1; 92(2):209-14.
26. Vidhyavathi, R., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. Expression of carotenogenic genes and carotenoid production in *Haematococcus pluvialis* under the influence of carotenoid and fatty acid synthesis inhibitors. *Enzyme and Microbial Technology*. 2009; 45(2), 88-93.
27. Amos R. Handbook of Microalga. Culture Biotechnology and applied Phycology. Blackwell publishing. India. 2005
28. Vázquez Perea, Y., Villamil Poveda, J., Sánchez Leal, L., & Lancheros Díaz, A. Evaluación de un sistema de medio fijo como soporte para una película microbiana capaz de reducir Cr (VI) de lodos residuales de curtiembres. *Nova*. 2014. 12(21). <https://doi.org/10.22490/24629448.996>
29. Culture Collection of Algae at The University at Austin (UTEX). Composición de medios para microalgas. [Internet]. . [Citado 2019 septiembre 20]. Disponible en: <https://utex.org/products/volvox-medium>
30. Rodríguez, R. L. J. Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo efecto de factores de estrés como acetato de sodio y cloruro de sodio combinadas con alta intensidad de luz. 2019. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.





**NOVA Publicación Científica  
en Ciencias Biomédicas**

# ***In vitro* antimicrobial activity of Douro wines against clinical *helicobacter pylori* strains**

Actividad antimicrobiana *in vitro* de los vinos del Duero sobre cepas clínicas de *helicobacter pylori*

Lidia Po Catalao Dionisio<sup>1</sup>, Alejandro Manuel Labella<sup>2</sup>, María Palma<sup>3</sup>, Juan José Borrego<sup>4</sup>

## **Abstract**

**Aim.** *In vitro* antimicrobial activities of seven wines (5 reds and 2 whites) from the Douro region (Iberian Peninsula) against eleven clinical strains of *Helicobacter pylori* were evaluated. **Methods.** The disk diffusion method, using Columbia Agar supplemented with horse blood (CAB), were used to determine the antimicrobial properties of some wine components against *H. pylori* strains. Potential interactions of antioxidants contained in the wines and two antimicrobials (amoxicillin and metronidazole) were studied by the disk diffusion method. **Results.** All the tested strains showed growth in CAB supplemented with 9% of the tested wines but none of them grew in media supplemented with 45% and 67.5% of wine. Similarly, all the tested strains grew in media with the concentration of proanthocyanidins present in the different types of the studied wines. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) values of the wine antioxidant components tested (benzoic acid, catechin, quercetin, and resveratrol) indicate that resveratrol was the most powerful inhibitory substance against *H. pylori*. An effect of potentiation between amoxicillin and metronidazole and the antioxidants tested was also established. The interaction of amoxicillin and resveratrol or metronidazole and catechin increased the antimicrobial activity against *H. pylori*. **Conclusions.** The results obtained suggested a potential role of resveratrol as a chemopreventive agent for *H. pylori* infection.

**Keywords:** *helicobacter pylori*, antioxidants, antimicrobial activity, Douro wine, resveratrol, proanthocyanidins.

1. PhD in Biology. MED-Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development. Pólo do Algarve. Campus de Gambelas 8005, 139-Faro, Portugal.  
ORCID: 0000-0002-0530-9395.

2. PhD in Microbiology. Department of Microbiology, University of Malaga, Campus Universitario Teatinos, 29071-Málaga, Spain.  
ORCID: 0000-0001-9446-6458.

3. PhD in Food Consumption and Nutrition. Escola Superior de Saúde da Universidade do Algarve, Campus de Gambelas 8005, 139-Faro, Portugal.  
ORCID 0000-0002-9278-5540

4. PhD in Microbiology. Department of Microbiology, University of Malaga, Campus Universitario Teatinos, 29071-Málaga, Spain.  
ORCID: 0000-0002-2174-0652.

Corresponding author: J.J. Borrego. E-mail: jjborrego@uma.es

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus Universitario Teatinos, 29071-Málaga, España.  
Tel.: +34-952131893. Fax: +34-952136645

## Resumen

**Objetivo.** Se evaluó las actividades antimicrobianas *in vitro* de siete vinos (5 tintos y 2 blancos) de la región del Duero (Península Ibérica) frente a once cepas de *Helicobacter pylori* de origen clínico. **Métodos.** Para determinar las propiedades antimicrobianas de algunos componentes del vino sobre las cepas de *H. pylori* se utilizaron las técnicas de difusión en disco en placas de agar Columbia suplementado con sangre de caballo (CAB). La potencial interacción entre las sustancias antioxidantes presentes en los vinos y dos antimicrobianos (amoxicilina y metronidazol) se determinó usando la técnica de difusión en disco. **Resultados.** Todas las cepas ensayadas mostraron crecimiento en CAB suplementado con el 9% de los vinos analizados, pero no se obtuvo crecimiento de ninguna de las cepas en medios suplementados con el 45% y el 67,5% de vino. Asimismo, todas las cepas ensayadas crecieron en medios con la concentración de proantocianidinas presentes en los diferentes tipos de vinos estudiados. Los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de los componentes antioxidantes de los vinos ensayados (ácido benzoico, catequina, quercetina y resveratrol) indican que el resveratrol fue la sustancia más potente en la inhibición del crecimiento de *H. pylori*. También se estableció un efecto de potenciación entre amoxicilina y metronidazol y los antioxidantes ensayados. Las interacciones amoxicilina + resveratrol y metronidazol + catequina aumentaron la actividad antimicrobiana contra *H. pylori*. **Conclusiones.** Los resultados obtenidos sugieren un papel potencial del resveratrol como agente quimiopreventivo de la infección por *H. pylori*.

**Palabras claves:** *helicobacter pylori*, antioxidantes, actividad antimicrobiana, vinos del Duero, resveratrol, proantocianidinas.

## Introduction

*Helicobacter pylori* is accepted to be the causative agent of acute and chronic gastritis, and a major predisposing factor for peptic ulcer disease, gastric carcinoma, gastric lymphoma and mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) (1, 2). This microorganism is a spiral-shaped Gram-negative bacterium endowed with a very powerful urease activity and with polar flagella. Urease activity buffers the pH at the cell surface, allowing

bacterial survival in the stomach lumen until it enters the mucus layer by means of their flagella, which is a protective barrier against the high proton concentration (3). To colonize the host stomach, *H. pylori* expresses several virulence factors that can play a role in pathogenesis, being the most important the vacuolating VacA, a cytotoxin associated with gene A (CagA), the neutrophil-activating protein (NAP), and the urease activity (4).

Peptic ulcer disease and other *H. pylori*-associated disorders usually regress or even heal completely after treatment with antimicrobials. The most effective and best tolerated combinations consist of a triple therapy which includes bismuth salts or proton pump inhibitors with two antibiotics (clarithromycin and amoxicillin, clarithromycin and metronidazole, or amoxicillin and metronidazole), and a quadruple therapy, including a proton pump inhibitor plus a bismuth salt and the antibiotics metronidazole and tetracycline (5, 6). However, the available antimicrobial therapies for *H. pylori* infection have several shortcomings: (i) limited efficacy *in vivo* of the antimicrobials due to both inability of drugs to achieve appropriate levels in the gastric mucus layer, and/or inactivation of drugs at low pH (7); and (ii) the development of antimicrobial resistance for *H. pylori* (8-10). Consequently, an optimal therapy against *H. pylori* infection is not available yet, therefore, novel approaches are needed, including vaccine development (11), use of antimicrobial peptides (12), and utilization of naturally occurring compounds with antimicrobial activity, such as porphyrins, essential oils and plant polyphenols (13-15).

Several epidemiological studies have demonstrated that the modest consumption of alcoholic drinks may influence spontaneous eradication of *H. pylori* (16, 17). Alcoholic beverages, mainly wine, have a strong antimicrobial activity, as has been shown both *in vitro* and *in vivo* (18, 19); however, other conditions depending on the beverage type,

dose, host physiological conditions, to name a few, affect to the *H. pylori* mechanisms of action and may explain the inconsistent results obtained by several authors (19, 20). Marimon *et al.* (21) carried out an *in vitro* analysis of the bactericidal action of red wine, HCl solution (pH 3.5), a solution containing 12% ethanol, and 12% ethanol at pH 3.5 on *H. pylori*. Red wine exerted a higher bactericidal effect upon *H. pylori* than that other observed for the other solutions. However, no explanation was found for the mechanisms by which wine exerts an *in vitro* bactericidal effect independently of its alcohol concentration, nor have the substances responsible been identified to date.

In the present study, the antibacterial effect of different wines from the Douro region (Iberian Peninsula) and their main components (proanthocyanidins, pH, alcohol content and four antioxidant compounds) on *H. pylori* strains (isolated from gastric biopsies) has been evaluated. In addition, the potential interactions between amoxicillin or metronidazole and the antioxidant components of the wine have also been evaluated.

## Materials and methods

### *Bacterial strains, culture and identification*

Eleven clinical strains of *H. pylori* isolated from gastric biopsies and a reference stra-

in (CCUG 15813) from the Culture Collection of the University of Gothenburg (Sweden) have been used in this study. Strains were subcultured on Columbia Agar (Oxoid, Hampshire, UK) supplemented with 10% of defibrinated horse blood (Oxoid) (CAB) and in CAB with Dent's supplement (SR 147, Oxoid). Subcultures were incubated at  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  under microaerophilic conditions using jars with Gas generating kits for *Campylobacter* (Oxoid) for 48-72 h (22). All isolates were identified as *H. pylori* using the phenotypic and biochemical tests described previously (23). The urease activity was performed using Urea Broth Medium (Oxoid) with the SR20 20K supplement (Oxoid).

#### *Antibiotic susceptibility assays and PCR-based genotyping*

Disk diffusion testing was performed by standard CLSI methods (24) using CBA for the evaluation in vitro of the antibiotic susceptibility of *H. pylori* strains against the following antimicrobials, used frequently for treatment of *H. pylori* infection, supplied by Oxoid: metronidazole, clarithromycin, erythromycin, amoxicillin, ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin, rifabutin, furazolidone, and tetracycline. Inocula were prepared from two agar plates of a 2-day fresh growth on CBA, which were scraped and suspended in 5 ml of Columbia broth (CB) (Oxoid) to achieve the turbidity equivalent to a McFarland standard of 3 to 4. Serial dilutions of the bacterial suspensions

were performed to yield a colony count of about  $4 \times 10^8$  CFU/mL. After incubation period (48-72 h) at  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  under a microaerophilic atmosphere, inhibition zone diameters (in mm) were read with the aid of callipers. Bacterial isolates were classified as resistant, sensitive or intermediate according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards breakpoints (25). Genomic DNA of *H. pylori* isolates was extracted as described by Oleastro et al (26). Genotyping of the virulence factors vacuolating gene (*vacA*) and cytotoxin-associated gene (*cagA*) was performed by PCR in accordance to protocols and primers described previously (27, 28).

#### *Determination of the Minimal Inhibitory Concentrations (MICs)*

E-test strips supplied by AB Biodisk (Solna, Sweden) were used to determine the MICs of amoxicillin and metronidazole. CBA plates were allowed to dry for 10 min and the strips were kept on the bench for 10-15 min to attain room temperature. Colonies from pure cultures of *H. pylori* were transferred using a sterile loop into a sterile tube containing 4.5 ml of CB and adjusted to standard 2 of the MacFarland scale. The solution was flooded over the plate (CBA) and excess fluid was removed with a pipette. After drying for 15-20 min, an E-test strip was placed on each plate and then incubated under microaerophilic conditions at  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  for 48-72 h. Results from E-test were interpreted by recording the point of

intersection of the growth elliptic margin zone with the MIC scale value on the E-test strip. MIC breakpoints of  $>2 \mu\text{g/ml}$  and  $>8 \mu\text{g/ml}$  were used for amoxicillin and metronidazole, respectively.

### *Susceptibility assays of the wines and their components*

Seven different wines of Douro region, 5 reds and 2 whites, were used to determine the susceptibility of *H. pylori* strains. Four red wines were product of monocastes each one named Touriga Nacional, Touriga Brasileira, Tinta Roiz, and Tinta Barroca. The fifth one was a mixture of castes Negra mole, Castelao and Trincadeira. The wines were previously filtered through membrane filters of  $0.45\text{-}\mu\text{m}$  pore-size (Millipore Co., Belford, MA, USA), and several concentrations of each filtered wine were added to culture media in aseptic conditions. Four different assay media were prepared; all of them were composed of 39 g/L of CAB and variable percentages of filtered wine (9% for medium 1, 22.5% for medium 2, 45% for medium 3, and 67.5% for medium 4).

To control the effect of alcohol graduation in the growth of *H. pylori*, several compositions of CAB supplemented with ethanol were performed. The final proportion of alcohol in media tested were  $12.69^\circ$  (v/v),  $13^\circ$  (v/v),  $14.55^\circ$  (v/v) and  $14.8^\circ$  (v/v). In addition, *H. pylori* was grown in CAB plates at low pH values (from 4.49 to 4.89) by adding of lactic acid (10%).

Proanthocyanidins were isolated from several red wine grapes originating from the Douro region. The pips were carefully removed from 150 frozen grapes and then lyophilized. The dry extract was stored at  $-20^\circ\text{C}$  until use. Proanthocyanidins of the extract were separated and identified by HPLC following the protocol described by Roggero *et al* (29). The detection of proanthocyanidins was performed by the monitorization of the absorbance detected at 535 nm in a DAD (Merck, Madrid, Spain). The proanthocyanidin concentrations were calculated attending to the calibration line obtained by the use of maldivin as pattern. Different concentrations of proanthocyanidins in distilled water according to the values of HPLC of the tested wines (0.93 g/L for Touriga Nacional, 0.63 g/L for Tinta Barroca, 0.50 g/L for Tinta Roriz, and 0.34 g/L for Touriga Brasileira) were added to the CAB to achieve a concentration of 67.5% (v/v). Inoculated plates were incubated at  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  under a microaerophilic atmosphere for 72 h.

Considering the total phenol index as the equivalent to gallic acid units calculated by the Folin-Ciocalteu's method. The total phenolic compounds of the wines were determined by the absorbance values at 725 nm of different concentrations of gallic acid. The agar dilution method (30) was used to determine the MICs of the antioxidant compounds present in the wines. The antioxidants used were benzoic acid (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, Spain), catechin (Sigma-Aldrich), quercetin



(Sigma-Aldrich) and resveratrol (Sigma-Aldrich), and they were prepared in deionised water. Media consisted of CBA with the antioxidant compounds tested at concentrations of 0.01 to 0.1 mg/mL in doubling dilutions. Inocula of 10 µL of bacterial suspension of each *H. pylori* strain (about  $4 \times 10^8$  CFU/mL) were applied on the surface of the growth medium. Plates were incubated at  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  under a microaerophilic atmosphere for 72 h. The lowest concentration of antioxidant compound showing no growth was recorded as the MIC. All the susceptibility assays were three-times replicated.

To determine the possible interaction between amoxicillin and/or metronidazole and the wine antioxidants, 10 µg of each antioxidant agent tested was added to each aqueous antibiotic solution containing amoxicillin (25 µg) or metronidazole (5 µg). Later, the antibiotic solutions supplemented with the antioxidants were tested according to the broth microdilution method (25). A t-student test was applied to determine the statistical differences of the susceptibility of the bacterial strains to the antimicrobials and to the interactions antimicrobial-antioxidant agents.

## Results

### Characterization of the *H. pylori* strains

All the isolates collected from endoscopic biopsies were confirmed as *H. pylori* according to 23 phenotypic features tested specified by Megrauf and Lee (23) (data not shown). The molecular characterization of the *H. pylori* isolates using a PCR-based method allowed the discrimination of the isolates in three groups on the basis of the presence/absence of the virulence factors CagA and VacA (Table 1). Group 1 (Cag A +/Vac A s1/m1, urease +) composed to 7 strains; group 2 (Cag A +/Vac A s1/m2, urease +), 3 strains; group 3 (Cag A -/Vac A s2/m2, urease +), 2 strains. Overall, ten strains (83.3%) presented the cytotoxin CagA, whereas all the strains showed the vacuolating factor VacA and the urease activity (Table 1). Antibiotic susceptibility of *H. pylori* showed that all the strains were susceptible to 10 antimicrobials tested, but only 4 strains were resistant to the concentration tested (50 µg) of metronidazole (Table 1).

**Table 1.** Distribution of *Helicobacter pylori* genotypes and antibiotic susceptibility using the disk diffusion method.

Strains	Genotypes	Me	C	E	AMO	Cp	MO	LE	Rf	F	Te
E2	Cag A +/Vac A s1/m2	Sa	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E4	Cag A +/Vac A s1/m1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E8	Cag A +/Vac A s1/m2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E9	Cag A -/Vac A s2/m2	Rb	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Strains	Genotypes	Me	C	E	AMO	Cp	MO	LE	Rf	F	Te
E10	Cag A +/Vac A s1/m1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E28	Cag A +/Vac A s1/m1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E120	Cag A +/Vac A s1/m1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E123	Cag A -/Vac A s2/m2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E126	Cag A +/Vac A s1/m2	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E128	Cag A +/Vac A s1/m1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E149	Cag A +/Vac A s1/m1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CCUG	Cag A +/Vac A s1/m1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Me: metronidazole; C: clarithromycin; E: erythromycin; AMO: amoxiellin; Cp: ciprofloxacin;

MO: moxifloxacin; LE: levofloxacin; Rf: rifatubin; F: furazolid; Te: tetracycline.

<sup>a</sup>S: sensitivity; <sup>b</sup>R: resistance

**Source:** Authors.

### *Effect of the types and concentrations of wine, pH, alcohol concentration and proanthocyanidins on H. pylori strains*

All strains tested showed growth in medium 1 composed of CAB supplemented with 9% of all the wines assayed. On the contrary, none of the strains grew in media 3 and 4 (45% and 67.5% of wine, respectively). In the case of the medium 2, variable results were obtained depending on the type of wine tested, for example, only 7 strains (E2, E4, E8, E28, E123, E126 and E149) showed growth at 22.5% of Siria white wine, and 3 strains (E120, E128 and CCUG 15813) grew at 22.5% of Negra-Castalao red wine.

All *H. pylori* strains tested grew in media without wine at pH values ranging 4.49 to 4.89. Similarly, all the strains showed an optimal growth at the ethanol concentrations tested (12.69°, 13°, 14.55° and 14.8° v/v).

Similarly, all the *H. pylori* strains showed growth in CAB supplemented with the concentration of proanthocyanidins present in the different types of wines (Table 2). Urea-se test was used to study the changes of *H. pylori* strains after growth with wine (9%) and proanthocyanidins (Table 2). Only the strain E126 loss the urease activity after grown in CAB supplemented with wine or proanthocyanidins; on the contrary, E8 and E128 strains maintained their urease activity for all the conditions assayed. An inverse but significant relationship was obtained between the response of the urease activity and the total phenol index of the red wine tested [ $y = -48x + 33$ ,  $r^2 = 0.914$ ,  $p < 0.001$ , where  $y$  is the absorbance at 750 nm and  $x$  is the concentration (mg/mL) of gallic acid].

**Table 2.** Response of the urease test of the *Helicobacter pylori* strains growth in CBA supplemented with 9% red wine and proanthocyanidins (TPT).

Wine type	E2	E4	E8	E9	E10	E28	E120	E123	E126	E128	E149	CCUG
T. Roriz	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
TPT (0.5 g/L)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
T. Nacional	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
TPT (0.93 g/L)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
T. Barroca	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
TPT (0.63 g/L)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
T. Brasileira	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
TPT (0.34 g/L)	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-

Source: Authors.

### Effect of antioxidant agents on *H. pylori* growth

The inhibitory activity exerted by the antioxidant compounds tested on the *H. pylori* growth depending both of the strain and the concentration of the antioxidants. The benzoic acid did not demonstrate to possess any effect on the tested strains at any assayed concentrations. On the contrary, the

resveratrol showed the highest growth inhibition rates for all the tested strains, even at the lower concentration assayed (0.1 mg/mL), and 91.7% of the strains possessed a (MIC) lower than 50 µg (Table 3). On the other hand, only 33.3% of the tested strains presented a MIC lower than 50 µg for quercetin, and 58.3% of them have MIC lower than 50 µg for catechin (Table 3).

**Table 3.** MIC values (µg/mL) determined by the dilution agar test of several antioxidant compounds present in red wine on *H. pylori* strains.

Antioxidants	E2	E4	E8	E9	E10	E28	E120	E123	E126	E128	E149	CCUG
Benzoic acid	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Catechin	10-50	>100	10-50	>100	50-100	10-50	>100	10-50	10-50	10-50	>100	10-50
Quercetin	>100	>100	>100	>100	10-50	10-50	>100	>100	>100	<10	>100	10-50
Resveratrol	10-50	<10	10-50	10-50	10-50	10-50	<10	<10	<10	10-50	50-100	<10

Source: Authors.

## Interaction between antimicrobial agents and antioxidants tested

Amoxicillin and metronidazole were choose to perform the interaction effects with antioxidant compounds on the basis of their susceptibility patterns on *H. pylori* strains tested (Table 1). Table 4 presents the results of potentiation or antagonism that produced the combination of antimicrobials and the antioxidant agents. The results obtained were very variable, depending both of the combination and the strains tested.

In the case of amoxicillin, resveratrol was the antioxidant that provoked a higher number of potentiation of the antimicrobial agent, since 50% of the *H. pylori* strains (E4, E8, E10, E120, E126 and CCUG) increased

their susceptibility with the combination antimicrobial-antioxidant. However, two strains (E28 and E149) decrease their sensitivity with the combination compared to the effect of the antimicrobial alone. For metronidazole, the antibiotic-resistant strains E9, E10, E126 and E128 showed susceptibility to the antibiotic supplemented with catechin or benzoic acid. For the other strains tested, the combination metronidazole and antioxidant compounds only provoke potentiation effect in strains E120 and E123 with the combinations metronidazole-catechin, metronidazole-quercetin and metronidazole-resveratrol. On the contrary, in the strains E8, E28, E149 and CCUG an antagonism effect was recorded with all the combinations tested (Table 4).

**Table 4.** Interactions between antimicrobials and wine antioxidants on the susceptibility of *H. pylori* strains.

Combinations	E2	E4	E8	E9	E10	E28	E120	E123	E126	E128	E149	CCUG
Amoxicillin + Benzoic acid	NS <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>	NS	A <sup>c</sup>	NS	NS	NS	NS	P	P	A	P
Amoxicillin + Catechin	NS	P	NS	A	NS	A	NS	NS	P	P	NS	P
Amoxicillin + Quercetin	NS	P	NS	A	NS	A	NS	P	P	NS	A	P
Amoxicillin + Resveratrol	NS	P	P	NS	P	A	P	NS	P	NS	A	P
Metronidazole + Benzoic acid	A	NS	A	P	NS	A	A	NS	NS	NS	A	A
Metronidazole + Catechin	NS	NS	A	NS	P	A	P	P	P	P	A	A
Metronidazole + Quercetin	NS	NS	A	NS	NS	A	NS	P	NS	NS	A	A
Metronidazole + Resveratrol	NS	NS	A	NS	NS	A	P	P	NS	NS	A	A

<sup>a</sup>NS: No significant effect; <sup>b</sup>P: Potentiation (significant at p<0.05 level, t-student test);

<sup>c</sup>A: Antagonism (significant at p<0.05 level, t-student test)

**Source:** Authors.

## Discussion

The frequent use of a limited number of antibiotics for anti-*H. pylori* therapy has resulted in the development of resistance mechanisms in *H. pylori* strains (1, 8, 31). Therefore, it is necessary to study other approaches to control the *H. pylori*-related chronic inflammatory processes and mediators responsible for carcinogenesis. Phytochemicals is a term for plant products that are active on biological systems. Some of them, present in red ginseng, green tea, or red wine, are known to inhibit *H. pylori* colonization, decrease gastric inflammation by inhibiting cytokine and chemokine release, and repress precancerous changes by inhibiting nuclear factor-kappa B DNA binding, inducing profuse levels of apoptosis and inhibiting mutagenesis (31, 32).

The results obtained in the present study show that red wines from the Douro region, at concentration of 22.5%, inhibited the *in vitro* growth of all the *H. pylori* strains tested. However, the two white wines tested allowed the growth of some *H. pylori* strains at this concentration (22.5%) (data not shown). The inhibitory effect of wines on the growth of several enteropathogens, including to *H. pylori*, has been previously described (33-35). Marimon et al (21) demonstrated that red wine exerted a marked bactericidal effect upon *H. pylori*, and this effect could not be attributed to the acid pH of wine or at its alcohol concentration. Similar results have been obtained in our

study, since none of the strains tested were inhibited by the four ethanol concentrations tested (from 12.69° to 14.8° v/v) and for the pH range (from 4.49 to 4.89). Our results suggested that the viability of the *H. pylori* strains grown in wine might depend on the antioxidant and other phenolic components of the wine. A relationship between the phenotypic characteristics and virulence factors of the strains might be established with the susceptibility to 22.5% of wine. However, no convincing explanation has yet been found for the mechanism by which wine exerts and *in vitro* bactericidal effect independently of its alcohol concentration. *In vivo* mechanisms that could contribute to the protective effect of wine might be the rise in acid secretion, and the increase in intestinal motility (18).

Polyphenols are plant secondary metabolites, which have. Wine, particularly red, contains a variety of polyphenols derived from the skin of the grape, including flavonols (quercetin), stilbenes (resveratrol), flavanols (catechin), gallic acid, condensed tannins (catechin polymers), and polymeric anthocyanins (36). These polyphenolic compounds potential health benefits on the human organism, mainly as antioxidants, anti-allergics, anti-inflammatories, anticarcinogenics, decrease platelet aggregation and endothelial adhesion, and decrease the level of high-density lipoprotein cholesterol (37-39). Several authors have demonstrated that the main active phenolic compound present in the red wine against *H. pylori* is the resveratrol (33, 40, 41). Resveratrol

exhibits a number of biological activities, including anti-inflammatory, antioxidant, platelet antiaggregatory and anticarcinogenic properties, and modulation of lipoprotein metabolism (42). The results obtained in the present study for resveratrol assays showed higher inhibitory effects on *H. pylori* strains tested than those obtained for the other phenolic compounds tested, catechin and quercetin (Table 3). Similar results have been reported by Mahady *et al.* (43), who obtained a MIC of 12.5 µg/mL (range of 6.25-25 µg/mL) for *H. pylori* VacA and CagA +. However, in our study a no significant difference on the resveratrol effect on the sensitivity of *H. pylori* CagA + and CagA – strains was obtained. The mechanisms of action of resveratrol are very wide (44), and related to *H. pylori*, Tombola *et al.* (15) suggested that this phenolic compound potentially inhibits the VacA, a cytotoxin that plays an important role in the *H. pylori* colonization and survival in the stomach, and, in addition, it causes epithelial damage (45, 46).

*H. pylori* is susceptible to many antibiotics *in vitro*, although only a few of them can be used *in vivo* to treat the microbial infection. Several authors have suggested that several phytochemical substances can be used either as monotherapy or in combination with antimicrobials (8, 12). In the present work, we have studied the potential interaction between two antimicrobials frequently used in the *H. pylori* therapy and the antioxidants present in red wine. The combination of amoxicillin with resveratrol

showed the higher inhibitory effect; on the contrary, for metronidazole only a significant effect was obtained in the resistant strains for the catechin. Similar potentiation effects between antioxidants and antibiotics have been reported previously (47, 48). However, alcoholic drinks cannot be consumed under metronidazole treatment because of a disulfiram-like reaction.

In short, the results obtained in this study demonstrate that red wine and resveratrol inhibit the growth of *H. pylori* strains *in vitro* and may support their role as chemopreventive agents of the bacterial infection or the insurgence in *H. pylori* infected individuals. However, due to the clinical guidelines for the treatment of dyspepsia recommend the stopping of ingestion of alcoholic beverages, further studies based on the effect of the ingestion of antioxidant substances, such as resveratrol, which has shown an inhibitory effect on *in vitro* growth of *H. pylori* strains, could be necessary for the development of clinical treatments using resveratrol as chemopreventive agent.

### Acknowledgements

This study was partially supported by a grant from Foundation for Science and Technology and by FEDER through the Programme POCTI (POCTI/ESP/41217). We thank to Ana Vieira and Rui Pina for their helpful assistance in chemical analysis.



## References

1. Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19:449-490. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1539101/pdf/0054-05.pdf>
2. Du MQ, Isaccson PG. Gastric MALT lymphoma: from aetiology to treatment. *Lancet Oncol.* 2002; 3:97-104. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470204502006514?via%3Dihub>
3. Sachs G, Weeks DL, Melchers K, Scott DR. The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Physiol.* 2003; 65:349-369. <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142156>
4. Dundon WG, de Bernard M, Montecucco C. Virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol.* 2001; 290:647-658. doi: 10.1016/s1438-4221(01)80002-3.
5. Laheij RJ, Rossum LG, Jansen JB, Straatman H, Verbeek AL. Evaluation of treatment regimens to cure *Helicobacter pylori* infection: a meta-analysis. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999; 13:857-864. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1365-2036.1999.00542.x>
6. Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, Hungin APS, Jones R, Axon A, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002; 16:167-180. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1365-2036.2002.01169.x>
7. Debets-Ossenkopp YJ, Namavar F, MacLaren DM. Effect of an acidic environment on the susceptibility of *Helicobacter pylori* to trospectomycin and other antimicrobial agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1995; 14:353-355. doi: 10.1007/BF02116532.
8. Gerrits MM, van Vliet AHM, Kuipers E, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *The Lancet Infect Dis.* 2006; 6:699-709. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309906706272?via%3Dihub>
9. Macias-Garcia F, Llovo-Taboada J, Diaz-Lopez M, Baston-Rey I, Dominguez-Munoz JE. High primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from dyspeptic patients: a prevalence cross-sectional study in Spain. *Helicobacter.* 2017;22: e12440. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/hel.12440>
10. Alba C, Blanco A, Alarcon T. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Infect Dis.* 2017;30: 489-497. [https://journals.lww.com/co-infectiousdiseases/Fulltext/2017/10000/Antibiotic\\_resistance\\_in\\_Helicobacter\\_pylori.8.aspx](https://journals.lww.com/co-infectiousdiseases/Fulltext/2017/10000/Antibiotic_resistance_in_Helicobacter_pylori.8.aspx)
11. Walduck AK, Raghavan S. Immunity and vaccine development against *Helicobacter pylori*. In: Kamiya S, Backert S, eds. *Helicobacter pylori in Human Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1149, Cham.: Springer; 2019. p. 257-275. [https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F5584\\_2019\\_370](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F5584_2019_370)
12. Collado MC, Gonzalez A, Gonzalez R, Hernandez M, Ferrus MA, Sanz Y. Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by bifidobacterium against *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 25:385-391. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857905000312?via%3Dihub>
13. Stojiljkovic I, Evavold BD. (2001) Antimicrobial properties of porphyrins. *Expert Opin Investig Drugs.* 2001; 10:309-320. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/13543784.10.2.309>
14. Ohno T, Kita M, Yamaoka Y, Imamura S, Yamamoto T, Mitsufuji S, et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 2003; 8:207-215. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1523-5378.2003.00146.x?sid=nlm%3Apubmed>
15. Tombola F, Campello S, De Luca L, Ruggiero P, Del Giudice G, Papini E, et al. Plant polyphenols inhibit VacA, a toxin secreted by the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEBS Lett.* 2003; 543:184-189. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/S0014-5793%2803%2900443-5?sid=nlm%3Apubmed>

16. Eurogast Study Group. Epidemiology of, and risk factors for, *Helicobacter pylori* infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. *Gut*. 1993; 34:1672-1676. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1374460/>
17. Brenner H, Rothenbacher D, Bode G, Adler G. Relation of smoking and alcohol and coffee consumption to active *Helicobacter pylori* infection: Cross sectional study. *Br Med J*. 1997; 315:1489-1492. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2127930/>
18. Bujanda L. The effects of alcohol consumption upon the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol*. 2000; 95:3374-3382. <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=11151864>
19. Brenner H, Bode G, Adler G, Hoffmeister A, Koenig W, Rothenbacher D. Alcohol as a gastric disinfectant? The complex relationship between alcohol consumption and current *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiology*. 2001; 12:209-214. [https://journals.lww.com/epidem/Fulltext/2001/03000/Alcohol\\_as\\_a\\_Gastric\\_Disinfectant\\_\\_The\\_Complex.13.aspx](https://journals.lww.com/epidem/Fulltext/2001/03000/Alcohol_as_a_Gastric_Disinfectant__The_Complex.13.aspx)
20. Murray LJ, Lane AJ, Harvey IM, Donovan JL, Nair P, Harvey RF. Inverse relationship between alcohol consumption and active *Helicobacter pylori* infection: The Bristol *Helicobacter* Project. *Am J Gastroenterol*. 2002; 97:2750-2755. <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=12425543>
21. Marimon JM, Bujanda L, Gutierrez-Stampa MA, Cosme A, Arenas JI. In vitro bactericidal effect of wine against *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol*. 1998; 93:1392. <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=9707086>
22. Glupczynski Y. Culture of *Helicobacter pylori* from biopsies and antimicrobial susceptibility testing. In: Megraud F, Lee A, eds. *Helicobacter pylori: Techniques for Clinical Diagnosis and Basic Research*, Oxford: WB Saunders Company, p. 17-32. 1996.
23. Megraud F, Lee A. *Helicobacter pylori: Techniques for Clinical Diagnostics and Basic Research*. Oxford: WB Saunders Company; 1996.
24. CLSI/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Approved Standard M100-S19. Wayne: CLSI; 2009.
25. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Development of in vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters, 5th Ed. Philadelphia: American Society for Testing of Materials; 2018.
26. Oleastro M, Gerhard M, Lopes AI, Ramalho P, Cabral J, Guerreiro AS, et al. *Helicobacter pylori* virulence genotypes in Portuguese children and adults with gastroduodenal pathology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003; 22:85-91. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-002-0865-3>
27. Tummuru MKR, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: Evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun*. 1993; 61:1799-1809. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC280768/>
28. Atherton JC, Cao P, Peek RM. Mosaicism in the vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*. 1995; 270:17771-17779. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925817480100?via%3Dihub>
29. Roggero JP, Coen S, Archier P, Rocheville-Divorne C. Etude par C.L.H.P. de la reaction glucoside de malvidine-acetaldehyde-compose phenolique. *Conn Vigne Vin*. 1987; 21:163-168. <https://oeno-one.eu/article/view/1283>
30. Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20:280-322. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1865594/>
31. Ecclissato C, Marchioretto MAM, Mendonça S, Godoy APO, Guersoni RA, Deguer M, et al. Increased primary resistance to recommended antibiotics negatively affects *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter*. 2002; 7:53-59. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1523-5378.2002.00056.x?sid=nlm%3Apubmed>

32. Lee SY, Shin YW, Hahm KB. Phytoceuticals: mighty but ignored weapons against *Helicobacter pylori* infection. *J Dig Dis*. 2008; 9:129-139. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1751-2980.2008.00334.x>
33. Daroch F, Hoeneisen M, Gonzalez CL, Kawaguchi F, Salgado F, Solar H, et al. In vitro antibacterial activity of Chilean red wines against *Helicobacter pylori*. *Microbios*. 2001; 104:79-85. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11297014/>
34. Just JR, Daeschel MA. Antimicrobial effects of wine on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in a model stomach system. *J Food Sci*. 2003; 68:285-290. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2621.2003.tb14154.x>
35. Mørseth T, Daeschel MA. Wine is bactericidal to foodborne pathogens. *J Food Sci*. 2004; 69:M251-257. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09938.x>
36. Friedman M. Antibacterial, antiviral, and antifungal properties of wines and winery byproducts in relation to their flavonoid content. *J Agric Food Chem*. 2014; 62:6025-6042. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf501266s>
37. Kamei H, Hashimoto Y, Koide T, Kojima T, Hasegawa S. Anti-tumor of methanol extracts from red and white wines. *Cancer Biother Radiopharm*. 1998; 13:447-452. [https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/cbr.1998.13.447?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed&](https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/cbr.1998.13.447?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed&)
38. Belleville J. The French paradox: possible involvement of ethanol in the protective effect against cardiovascular diseases. *Nutrition*. 2002; 18:173-177.
39. Daglia, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol*. 2012; 23:174-181. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900701007213?via%3Dihub>
40. Mahady GB, Pendland SL. Resveratrol inhibits the growth of *Helicobacter pylori* in vitro. *Am J Gastroenterol*. 2000; 95:1849. <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=10926010>
41. Wang D, Xu Y, Liu W. Tissue distribution and excretion of resveratrol in rat after oral administration of *Polygonum cuspidatum* extract (PCE). *Phytomedicine*. 2008; 15:859-866. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711308000287?via%3Dihub>
42. Orallo F. Trans-resveratrol: a magical elixir of eternal youth?. *Curr Med Chem*. 2008; 15:1887-1898. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18691046/>
43. Mahady GB, Pendland SL, Chadwick LR. Resveratrol and red wine extracts inhibit the growth of CagA + strains of *Helicobacter pylori* in vitro. *Am J Gastroenterol*. 2003; 98:1440-1441. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2860858/>
44. Dong W, Zhong Y, Yang Z. Research progress of mechanism of action of resveratrol. *Pharmacol Pharm*. 2016; 7:170-175. DOI: 10.4236/pp.2016.74022
45. Ghiara P, Marchetti M, Blaser MJ, Tummuru MK, Cover TL, Segal ED, et al. Role of the *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, CagA, and urease in a mouse model of disease. *Infect Immun*. 1995; 63:4154-4160. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC173584/>
46. Salama NR, Otto G, Tompkins L, Falkow S. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect Immun*. 2001; 69:730-736. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC97945/>
47. Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious disease. *Phytomedicine*. 2008; 15:639-652. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711308001104?via%3Dihub>
48. Sung WG, Lee DG. Mechanism of decreased susceptibility for Gram-negative bacteria and synergistic effect with ampicillin of indole-3-carbinol. *Biol Pharm Bull*. 2008; 31:1798-1801. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18758080/>

## 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:***

- Asígnele 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://bvsalud.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 hepmitosis 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.

Muñoz 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/>

**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 Excel, 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.